

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Grado en Física



Trabajo de fin de grado:

**“RITMOS CIRCADIANOS EN DROSOPHILA”**

Andrés Martínez Fernández-Salguero

Tutora:

María del Carmen Lemos Fernández

Departamento de Física de la Materia Condensada

Septiembre 2018



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>I.1. <i>Drosophila Melanogaster</i></b> .....	5
<b>I.2. Ritmos Circadianos</b> .....	6
<b>I.3. Osciladores no-lineales acoplados</b> .....	7
<b>I.4. Biología</b> .....	11
I.4.1. Proteínas .....	11
I.4.2. Los genes y el ADN .....	11
I.4.3. Dogma central de la biología.....	12
a) Transcripción .....	12
b) Traducción.....	15
I.4.4 Reacciones enzimáticas y fosforilación. Cinética de Michaelis-Menten .....	15
<b>I.5. Mecanismo molecular</b> .....	16
<b>II. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA</b> .....	20
<b>II.1. Objetivos</b> .....	20
<b>II.2. Metodología y herramientas</b> .....	20
<b>III. DESARROLLO DE LOS CONTENIDOS</b> .....	20
<b>III.1. Biología computacional</b> .....	20
<b>III.2. Naturaleza de las oscilaciones</b> .....	22
<b>III.3. Herramientas del modelado</b> .....	23
<b>III.4. Modelos</b> .....	26
III.4.1. Oscilador de Van der Pol .....	26
III.4.2. Oscilador Goodwin .....	28
III.4.3. Modelo de Goldbeter 1995 .....	30
III.4.4. Modelo de Leloup y Goldbeter 1998 .....	34
Experimentación con el modelo .....	42

<b>IV. CONCLUSIONES</b> .....	43
<b>V. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	45

## RESUMEN

En 2017 el Premio Nobel de Medicina y Fisiología fue otorgado a Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young por “sus descubrimientos de mecanismos moleculares que controlan el ritmo circadiano” [1].

Los ritmos circadianos constituyen un reloj genético que ha permitido a la mayoría de los organismos adaptarse al entorno anticipándose a los cambios diarios que en él ocurren. La *Drosophila Melanogaster* (mosca de la fruta) es el organismo del que mejor conocemos los detalles de este tipo de reloj biológico, y en él se han centrado los estudios de los tres laureados con el Premio Nobel.

Los datos sobre genes, proteínas y redes celulares que se han acumulado en las últimas décadas, han hecho cada vez más necesario el uso de la biología computacional para dar sentido y comprender los complejos mecanismos regulatorios que intervienen en la célula. En este trabajo, tras familiarizarnos con el concepto de ritmos circadianos y los procesos biológicos que intervienen en su funcionamiento, se explican las herramientas matemáticas que utilizan los modelos teóricos para simular los ritmos circadianos.

Se exponen cuatro modelos matemáticos diferentes para los ritmos circadianos (dos de ellos genéricos y otros dos específicos de *Drosophila*), todos ellos basados en sistemas de ecuaciones diferenciales no lineales y en los que un ciclo de realimentación negativa constituye el corazón de las oscilaciones.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 *Drosophila Melanogaster*

La *Drosophila Melanogaster* es el nombre científico con el que se conoce a la mosca de la fruta o del vinagre. Esta mosca es muy conocida en los hogares por aparecer en la fruta en descomposición durante los meses de primavera y verano.

Esta especie se utiliza con frecuencia en experimentación genética por su reducido número de cromosomas (cuatro pares) y por su breve ciclo de vida (35-40 días) y facilidad de reproducción que permite estudiar muchas generaciones en poco tiempo. Ya se conoce el mapa completo de su genoma, y el 61% de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en el genoma de estos insectos.

Se observa en la naturaleza que la actividad locomotora de la *Drosophila* aumenta al acercarse el amanecer para disminuir cuando comienza el día, y aumenta nuevamente al acercarse el atardecer disminuyendo al caer la noche [2]. De igual manera, la eclosión de moscas adultas de sus crisálidas ocurre siempre en una ventana de tiempo de unas 8-10 horas que se abre 1-2 horas antes de que comience el día. Las moscas que no están del todo listas para su eclosión deberán esperar 24 horas a que se abra nuevamente la ventana para eclosionar [3].

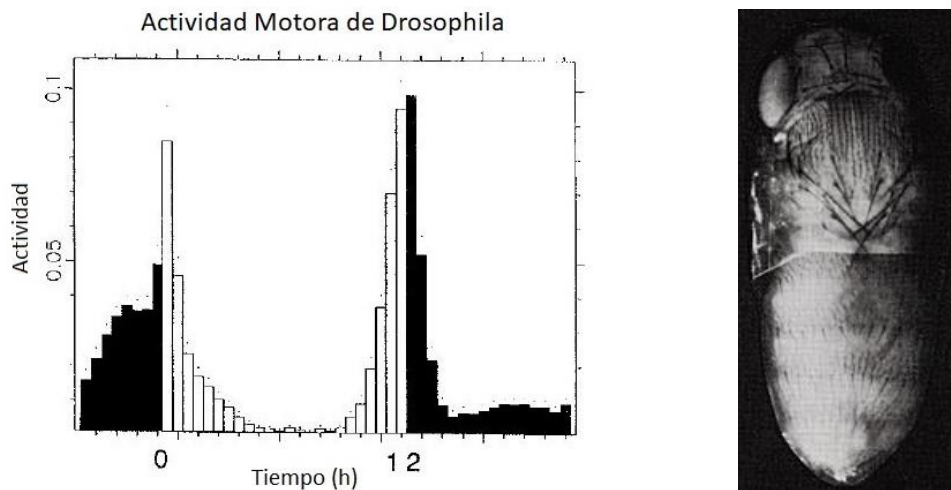


Figura 1: (izquierda) Histograma de la actividad motora de *Drosophila Melanogaster*. Imagen obtenida de [2]. Se aprecia cómo la mosca se anticipa al cambio de luz aumentando su actividad para alcanzar el máximo al amanecer y el anochecer. (Derecha) Etapa P15 (90-103 horas postfertilización) de *Drosophila Melanogaster*, inmediatamente antes de la eclosión. Imagen obtenida de [4]. La eclosión de las moscas adultas de sus pupas tiene lugar en una ventana de tiempo que se abre cada 24 horas.

Esto es sólo un ejemplo de cómo los organismos adaptan su comportamiento o incluso fisiología al momento del día. Ante estas evidencias se obtiene la impresión de que existe un reloj interno que permite al organismo saber cuándo van a llegar las horas de luz, y cuándo caerá la noche. Los ritmos circadianos son los que conforman este reloj interno, y debido a la facilidad de experimentación con *Drosophila* en los laboratorios de biología y genética, éste fue el primer organismo para el que se obtuvo información detallada sobre sus ritmos circadianos [5].

Descubrimientos de las últimas décadas han revelado sorprendentes similitudes entre los mecanismos moleculares de los relojes circadianos en la mosca de la fruta y otros organismos tan distintos como los ratones o el moho del pan [6]. En el caso de los mamíferos, por ejemplo, nuestro conocimiento del mecanismo molecular de sus ritmos circadianos resulta de una descripción detallada de componentes homólogos al mecanismo de *Drosophila* [7]. Por tanto, comprender la base molecular del sistema circadiano de *Drosophila* nos sirve para llegar a comprender el de otros organismos.

Este fue el organismo modelo utilizado por Hall, Rosbash y Young en las investigaciones que les hicieron merecedores del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 2017.

## **I.2 Ritmos Circadianos**

Los ritmos circadianos son ritmos biológicos que como su nombre indica presentan periodos de aproximadamente 24 horas (*circa* = alrededor de, *dies* = día). Lo más llamativo de estos ritmos es su capacidad de acoplarse al ciclo de luz-oscuridad natural del ambiente consecuencia de la rotación de la tierra. Así, dos moscas que se encuentren en dos zonas horarias diferentes tendrán sus relojes sincronizados a la luz local.

Los ciclos circadianos constituyen por tanto un reloj biológico interno cuya función es anticipar los ciclos día-noche, permitiendo a los organismos adaptar su fisiología y comportamiento a los cambios de luz y temperatura que tienen lugar en el entorno como consecuencia de la rotación de la tierra. Esta adaptabilidad supone una ventaja evolutiva que

permite una mayor optimización energética. Es por eso que estos ritmos se encuentran en todos los organismos eucariotas<sup>1</sup> y algunas bacterias<sup>2</sup> [8].

Este reloj interno son oscilaciones en los niveles de concentración de ciertas proteínas en el interior de las células. Estas oscilaciones tienen un período de 24 horas sincronizado con el ciclo de luz-oscuridad externo [9]. Veremos que las proteínas pueden realizar funciones muy diversas y, por tanto, las proteínas circadianas pueden regular diferentes parámetros fisiológicos.

En el caso de los humanos, las proteínas de nuestro reloj circadiano controlan los patrones de sueño, la temperatura corporal, la liberación de hormonas, la presión sanguínea y el metabolismo. Los descubrimientos de Hall, Rosbash y Young han revelado que la adaptación circadiana constituye un mecanismo fisiológico crucial con importantes implicaciones para la salud humana además de las ventajas adaptativas ya mencionadas [10]. Cuando hacemos un viaje largo y cambiamos de huso horario experimentamos el desajuste de nuestro ritmo circadiano con el ciclo externo de luz-oscuridad y nos lleva unos días la adaptación al nuevo horario. Este desajuste tiene efectos fisiológicos que conocemos comúnmente como *jet lag*.

En el caso de *Drosophila*, además de la actividad locomotora y el tiempo de eclosión de la crisálida, las proteínas circadianas regulan la respuesta olfativa [7].

### **I.3 Osciladores no-lineales acoplados**

El mecanismo circadiano constituye entonces un oscilador. A la hora de buscar un modelo matemático para estas oscilaciones sería un error asemejarlo a un oscilador lineal como el péndulo simple o el oscilador armónico. En los osciladores lineales la amplitud de oscilación depende de las condiciones iniciales, y al aplicarles una perturbación, su energía se ve modificada y la amplitud pasa a ser otra diferente. Dado que estamos tratando con un sistema biológico, sus características deben ser preferiblemente independientes de las condiciones iniciales, pues en el entorno se producen inevitablemente perturbaciones que afectan al sistema y éste debe ser robusto para paliar los efectos de dichas perturbaciones, de manera que pueda volver al estado de funcionamiento que tenía antes de que éstas se produjeran.

---

<sup>1</sup> Organismos cuyas células tienen un núcleo bien formado donde se encuentra almacenada la información genética. Se distinguen de los organismos procariotas los cuales no tienen núcleo definido en la célula. Parece que las células eucariotas evolucionaron a partir de las células procariotas.

<sup>2</sup> Organismos unicelulares procariotas.



Para que se den estas características, la dinámica del sistema ha de ser no lineal. Esto implica generalmente que el sistema sea disipativo necesitando un aporte de energía continuo, a diferencia del oscilador armónico que en ausencia de rozamiento funcionaría eternamente sin consumir energía [9].

A lo largo del trabajo veremos que el mecanismo molecular del reloj circadiano está basado en una realimentación negativa de las proteínas sobre los genes que las codifican, lo que aportará la no linealidad suficiente para el comportamiento deseado.

Es importante comprender que las oscilaciones circadianas no son una respuesta pasiva a los ciclos de luz-oscuridad externos, sino que son ritmos endógenos generados por el propio sistema y que tienen lugar en ausencia de cambios periódicos de luz o temperatura en el ambiente [11]. Desde que en 1729 el astrónomo francés Jean Jaques d'Ortous de Mairan estudiara las plantas de mimosa, observando que en condiciones de oscuridad continuada seguían abriendo y cerrando sus hojas rítmicamente como hacían bajo exposición a ciclos de luz-oscuridad [10], se ha demostrado para múltiples organismos que los ritmos circadianos continúan en condiciones de luz constantes [12]. En condiciones de oscuridad continuada el periodo de las oscilaciones endógenas no tiene exactamente 24 horas, sino que estas oscilaciones necesitan de la señal luminosa externa para que ambas estén en fase [9]. Así, un organismo inicialmente sincronizado con el ciclo luminoso del entorno de periodo igual a 24 horas, si lo sometemos a oscuridad continuada, el periodo de sus oscilaciones circadianas pasará a ser ligeramente diferente a 24 horas y se acabará desajustando del ciclo día-noche al que estaba sincronizado en el comienzo.

La sincronización con el ambiente ocurre cuando el periodo del oscilador iguala el periodo de la señal periódica externa de luz. En este caso, el oscilador se dice que es de fase fija, porque su fase relativa a la fase de la señal externa es constante. Para que las oscilaciones endógenas se puedan sincronizar a la señal externa, el periodo de dichas oscilaciones debe ser suficientemente cercano al periodo de luz-oscuridad al que se quiere acoplar, pues cuando la amplitud de la señal externa no es lo suficientemente alta o cuando los periodos son demasiado diferentes, se pierde la sincronización y se observan comportamientos complejos con oscilaciones irregulares y sin fase fija [11].

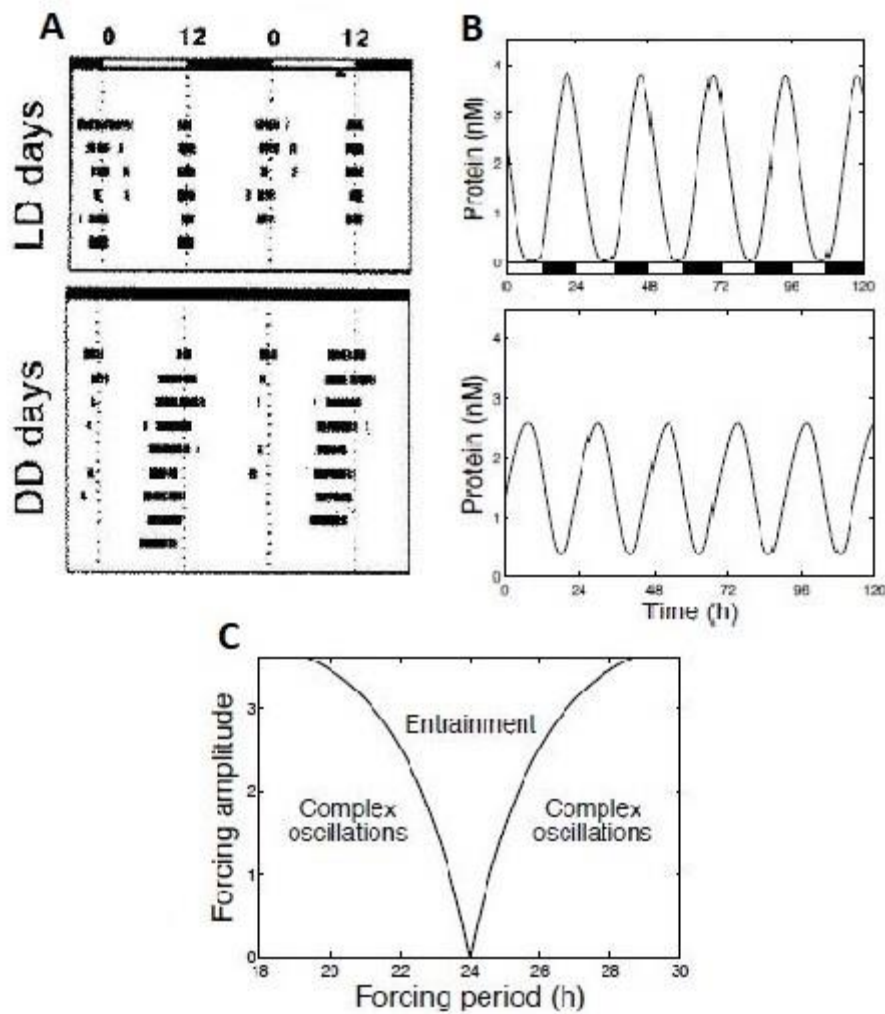


Figura 2: (A) Actograma<sup>3</sup> de *Drosophila* bajo ciclo de luz-oscuridad (arriba) y en oscuridad continua (abajo). Imagen tomada de [13]. (B) Oscilaciones del nivel de proteína en la célula bajo ciclo de luz-oscuridad (arriba) y en oscuridad continua (abajo). Imagen tomada de [11]. El ritmo endógeno se desincroniza del periodo de luz-oscuridad en condiciones de oscuridad continua, pues el periodo endógeno no es de exactamente 24 horas. (C) Región de acoplamiento (entrainment) en función de la amplitud y el periodo de la señal externa. Esta región se encuentra típicamente alrededor del periodo del oscilador endógeno. Imagen tomada de [11].

Hasta ahora lo que hemos comentado es válido para células individuales, y en este trabajo nos centraremos en los modelos que reproducen los ritmos circadianos producidos en el interior de una única célula. Sin embargo, como siempre, la realidad es más compleja, y los ciclos circadianos ocurren a nivel de tejidos (conjunto de células). Para lograr oscilaciones coherentes a este nivel son necesarios mecanismos de acoplamiento intercelular que sincronicen las oscilaciones entre diferentes células [11].

<sup>3</sup> Registro de las actividades locomotoras de un animal o un humano.

Es por eso que las proteínas circadianas (éstas son las que oscilan en periodos de 24 horas en el interior de la célula) regulan la producción de otras proteínas y hormonas que envían señales humorales<sup>4</sup> y a través del sistema nervioso, y permiten el ajuste de los ritmos vitales de otras células, logrando el acoplamiento de los relojes circadianos entre las distintas células [9].

Desde una perspectiva integral del organismo, se encuentran oscilaciones circadianas en la mayoría de órganos y tejidos del cuerpo; no existe por tanto un único reloj circadiano, sino más bien un conjunto de relojes circadianos, cada uno controlando diferentes expresiones rítmicas locales. En los mamíferos, el programa circadiano está regulado en los niveles nerviosos central y periférico. En el hipotálamo, concretamente en el núcleo supraquiasmático, hay un reloj que actúa de “marcapasos central”, pues es aquí donde la retina envía información de la luz del ambiente y permite la sincronización con el exterior. Este marcapasos regula los ritmos circadianos por todo el cuerpo a través del sistema nervioso periférico y por medios humorales. Las aves, por otra parte, tienen un complejo sistema circadiano compuesto por varios “marcapasos” acoplados en el cerebro, que sincronizan los relojes periféricos [7].

Nos encontramos ante una red de osciladores interconectados y retroalimentados. La forma en la que se relacionan el marcapasos central y los relojes periféricos junto con las entradas ambientales y locales que les afectan es un área de investigación actualmente abierta a nuevos descubrimientos. En este campo, la física tiene mucho que aportar y que investigar sobre cómo se logra un acoplamiento y sincronización de los osciladores que resulte en ritmos coherentes, estables y precisos de las actividades biológicas.

En la mosca de la fruta, a diferencia de aves y mamíferos, no encontramos un marcapasos central. Esto es debido a que en *Drosophila* los tejidos periféricos pueden acoplarse directamente a las señales del entorno. Por tanto se encuentran en ella numerosos osciladores sensibles a la luz (con propiedades de marcapasos) por toda la cabeza, abdomen y tórax, no siendo necesario ningún marcapasos central [7].

---

<sup>4</sup> Señales transmitidas por elementos disueltos en la sangre. Típicamente son reacciones que hacen frente a una infección y que actúan contra microorganismos extracelulares.

## **I.4 Biología**

Recordemos que los ritmos circadianos son en definitiva la oscilación en el nivel de concentración de una proteína en la célula. Por tanto, para comprender cómo se generan dichas oscilaciones a nivel molecular, es imprescindible conocer (a grandes rasgos al menos) los conceptos y procesos que intervienen en la síntesis de las proteínas en la célula.

### *1.4.1 Proteínas*

Las proteínas constituyen sin duda el material de la vida. Son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos (grupo de moléculas orgánicas formadas por grupos amino y un grupo ácido carboxílico). Además de la gran cantidad de combinaciones posibles de aminoácidos, la manera en la que se pliega la cadena puede dar lugar a características muy diversas. Esto resulta en una variedad enorme de tipos de proteínas que pueden realizar tareas muy diversas como la catálisis de reacciones químicas (enzimas), transporte y recepción de señales de una célula a otra, defensa del organismo (anticuerpos), transporte de moléculas y sustancias dentro de la célula, definir la estructura y forma de la célula, y movimiento de la propia célula [14].

### *1.4.2 Los genes y el ADN*

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es un ácido nucleico, al igual que el ARN (ácido ribonucleico). Estos ácidos nucleicos son cadenas de unas estructuras menores denominadas nucleótidos. Cada uno de estos nucleótidos está formado por un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa en el ADN y ribosa en el ARN) y una base nitrogenada (purinas o pirimidinas). En los nucleótidos del ADN se pueden encontrar cuatro tipos diferentes de bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). Estas bases se aparean dos a dos (A-T, C-G), de manera que una secuencia de nucleótidos sirve como molde para la síntesis de una cadena complementaria. El resultado es la característica estructura en forma de doble hélice y la capacidad de crear copias de sí misma.

Los nucleótidos se encadenan formando distintas combinaciones de las cuatro bases existentes, dando lugar a una serie ordenada de nucleótidos que, dependiendo de su orden, codifican una información u otra. Un fragmento de ADN que contiene la información para sintetizar una proteína se denomina gen.

El ARN es similar al ADN, salvo que en vez de timina posee una base nitrogenada diferente llamada uracilo (U). Esta base, al igual que timina, se enlaza con adenina. El ARN no posee estructura de doble hélice, sino que es una única cadena simple de nucleótidos. Esto la convierte estructuralmente en una molécula intermedia entre el ADN y las proteínas, aportándole una gran versatilidad. Aunque de manera menos eficiente que el ADN, pueden almacenar información, y aunque no pueden catalizar tantas reacciones como las proteínas, sí son capaces de catalizar ciertas reacciones especialmente importantes. Constituyen una herramienta fundamental en la célula realizando un amplio grupo de tareas: procesan la información contenida en el ADN, permiten la síntesis de proteínas y defienden a las células de algunos ataques de virus, entre otras cosas [14].

#### 1.4.3 Dogma central de la biología

El dogma central de la biología regula el proceso de biosíntesis de una proteína a partir de su gen (proceso de expresión génica). Este dogma establece que el flujo de información en las células va desde el ADN al ARN mensajero y, finalmente, a las proteínas. Para ello tienen lugar dos procesos: la transcripción y la traducción.

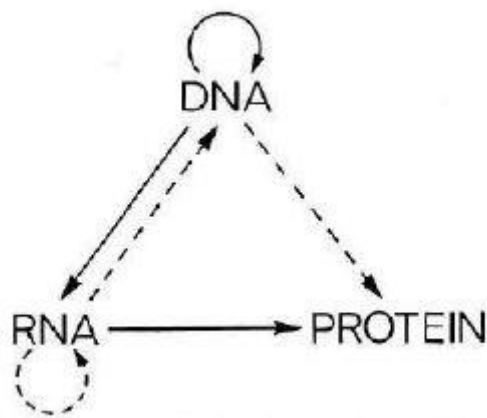


Figura 3: Diagrama del Dogma Central de la Biología. Las líneas continuas representan los procesos generales de la información genética, y las líneas discontinuas a casos especiales descubiertos en décadas recientes. Imagen tomada de [15].

##### a) Transcripción

La transcripción es un proceso por el cual se sintetiza una versión de ARN de la secuencia de ADN del gen cuya expresión va a tener lugar. Este proceso es llevado a cabo por una

enzima (proteína catalizadora) llamada ARN polimerasa, que sintetiza la molécula de ARN usando como molde la cadena de ADN. Las moléculas de ARN que contienen la información necesaria para dar lugar a una proteína reciben el nombre de ARN mensajeros (ARNm). En esta etapa el lenguaje químico utilizado no varía: la información sigue codificada en forma de secuencias de nucleótidos [14].

La velocidad a la que un gen se transcribe depende, entre otras cosas, de la interacción con ciertas proteínas y el promotor. El promotor corresponde a un tramo de ADN que precede al gen y al cual la ARN polimerasa debe unirse para iniciar la transcripción. La capacidad de la ARN polimerasa para anclarse al promotor está condicionada por proteínas específicas, conocidas como *factores de transcripción*. Los factores de transcripción pueden influir positiva o negativamente al proceso de transcripción. Así, los *activadores* son aquellos que promueven la unión de la ARN polimerasa con el promotor y aumentan la tasa de transcripción, mientras que los *represores* disminuyen la tasa de transcripción impidiendo o dificultando el anclaje de la ARN polimerasa [16]. Estos mecanismos de regulación de la transcripción son responsables de la capacidad de las células para responder a cambios en el ambiente o de la diferenciación celular, y su intervención es imprescindible para la aparición de oscilaciones circadianas.

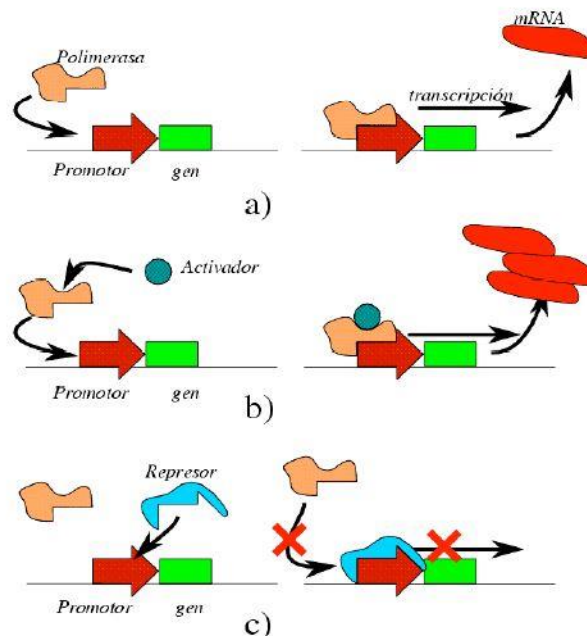


Figura 4: Transcripción génica, efecto de activadores y represores: a) La ARN polimerasa se une al promotor para copiar la información genética del ADN en una cadena de ARN mensajero. b) Una proteína activadora se une a la ARN polimerasa y potencia la transcripción. c) Un represor se une al promotor y bloquea la transcripción al impedir que la ARN polimerasa interactúe con el promotor. Imagen tomada de [16].

Para los objetivos de nuestro trabajo es necesario conocer cómo se simula matemáticamente el proceso de transcripción, o más concretamente, cómo se simula el proceso de transcripción cuando intervienen factores de transcripción represores. A pesar de la complejidad a nivel molecular de la interacción entre los genes y sus factores de transcripción, es posible, en la mayoría de los casos reales, modelar el proceso de manera sencilla mediante la función de Hill [16].

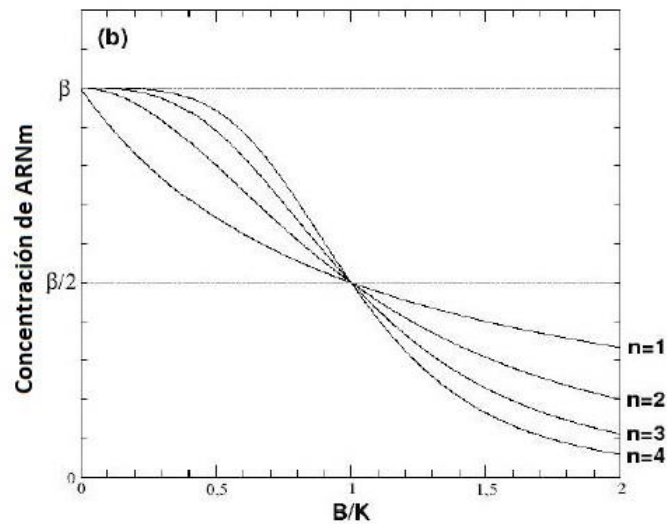


Figura 5: Función de Hill para factores de transcripción represores. Imagen tomada de [16].

En el caso de una proteína (B) que actúe como represora de la transcripción de un gen, la función de Hill de tipo sigmoide es decreciente (cuanto mayor sea B, menor será la tasa de transcripción) y depende de los siguientes factores: el nivel máximo de ARNm que podemos obtener,  $\beta$ ; el coeficiente de represión, K, que tiene unidades de concentración y se corresponde con la cantidad de B necesaria para obtener la mitad del valor máximo,  $\beta/2$ ; y el coeficiente de Hill,  $n$ , que mide la efectividad con que el factor de transcripción B actúa sobre la transcripción. Cuanto mayor sea el coeficiente de Hill, más se asemejará la función de Hill a una función escalón. El valor de  $n$  suele estar entre 1 y 4 [16]. La expresión de esta función es la siguiente:

$$\frac{d[ARNm]}{dt} = \frac{\beta}{1 + \left(\frac{B}{K}\right)^n}$$

Una vez sintetizada la molécula de ARN, ésta es procesada en el núcleo (procesos de corte y empalme, y adición de caperuza y cola) para convertirse en un ARNm maduro. Posteriormente es enviada al citoplasma (fuera del núcleo) para su traducción a proteínas.

## b) Traducción

En el citoplasma, la molécula de ARN mensajero es leída por la maquinaria celular (unos orgánulos celulares llamados ribosomas) y traducida a un lenguaje químico diferente: las secuencias de aminoácidos que forman las proteínas. Para ello, cada grupo de tres nucleótidos (llamado triplete o codón) se relaciona con un aminoácido específico. Así, en el proceso de traducción, la cadena de ARNm recorre el ribosoma dando lugar a otra cadena: la proteína, compuesta por aminoácidos. Esta etapa del proceso de expresión génica puede ser también regulada por otros factores que determinarán la cantidad final de proteína funcional obtenida a partir de un gen concreto [14].

La tasa de traducción se modelará por lo general como lineal frente a la cantidad de ARNm:

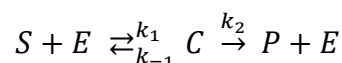
$$\frac{d[P]}{dt} = k[ARNm]$$

### *1.4.4 Reacciones enzimáticas y fosforilación. Cinética de Michaelis-Menten*

Las enzimas son proteínas que actúan de catalizadores de reacciones químicas en el interior de la célula. Sin ellas, las reacciones no ocurrirían a la velocidad necesaria para la vida. Estas proteínas acercan las moléculas reactantes, denominadas sustratos, y las orientan en una posición precisa, de manera que la interacción entre los átomos implicados en la reacción es más probable.

Muchas proteínas son modificadas después de su síntesis por enzimas que añaden o quitan un grupo fosfato. La fosforilación (adición de un grupo fosfato) y la desfosforilación (eliminación de un grupo fosfato) pueden provocar grandes cambios en la reactividad de las proteínas, por lo general llevándolas de un estado activo a uno inactivo y viceversa [14].

En 1913 Michaelis y Menten propusieron el siguiente mecanismo para las reacciones enzimáticas:



El sustrato (S) se une a la enzima (E) formando un complejo (C), y dando lugar posteriormente al producto y de nuevo la enzima. En el mecanismo tienen lugar dos tipos de reacción diferentes, una reversible y otra irreversible, donde  $k_{\pm 1}$  es la tasa de la reacción



reversible en uno y otro sentido, y  $k_2$  es la tasa de la segunda reacción. Estas tasas son constantes de proporcionalidad que tienen diferentes unidades.

Utilizando la Ley de Acción de Masas, aplicando la conservación de la cantidad de enzima total presente en el sistema (no se contempla la degradación o creación de nuevas enzimas) y considerando que la cantidad de sustrato es tan grande que es invariante, puede obtenerse la velocidad de una reacción enzimática:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 e_0 \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

donde  $K_m$  es la llamada constante de Michaelis-Menten, dada por  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ , y  $e_0$  es la cantidad de enzima total. La tasa máxima de producción es  $v_{m\acute{a}x} = k_2 e_0$  [17].

Se ha demostrado que la principal proteína causante de las oscilaciones circadianas en *Drosophila* (proteína PER) se degrada con mayor rapidez si está fosforilada. Además, los modelos contemplan la necesidad del estado fosforilado para que la proteína entre en el núcleo celular y para formar complejos con otra proteína muy importante, la proteína TIM [10].

## I.5 Mecanismo molecular

Ahora que nos hemos familiarizado con los conceptos y mecanismos biológicos asociados a los ritmos circadianos, estamos en disposición de comprender mejor los trabajos de los merecedores del Nobel de Fisiología y Medicina de 2017 Hall, Rosbash y Young. Veremos que los trabajos de estos científicos se basaron en grandes logros realizados en el campo de los ritmos circadianos por los ya fallecidos Seymour Benzer y Ronald Konopka.

Desde hace mucho tiempo se ha documentado que los organismos adaptan su fisiología al momento del día, es decir, circadianamente (apertura y cierre de hojas en la planta mimosa, ciclo vigilia-sueño y temperatura corporal en mamíferos, cambio en la sensibilidad ocular de las arañas lanzadoras de tela, etc.). Sin embargo, hasta bien entrado el siglo XX, no se estableció la concepción de que estos cambios fisiológicos tuvieran su origen en un reloj circadiano interno [10].

En la década de 1960 Seymour Benzer y Ronald Konopka [18] se propusieron encontrar un origen genético de los ritmos circadianos. Se dedicaron a aislar mutaciones de *Drosophila* con comportamiento circadiano alterado y que tuvieran mutaciones en genes individuales.

Es interesante destacar que por aquel entonces la comunidad científica rechazaba la idea de que cambios específicos en el comportamiento estuvieran influenciados por la acción de genes individuales. Encontraron tres mutaciones con alteraciones en su ritmo circadiano, y los ensayos genéticos de aquel tiempo sugirieron que todas ellas eran debidas a alteraciones en el mismo gen, el gen *period*. Los ritmos de estas mutaciones poseían las siguientes características en su periodo: arrítmico, periodo corto (19h) y periodo largo (28h) [10]. Estas tres alteraciones del gen *per* se designan respectivamente *per<sup>0</sup>*, *per<sup>S</sup>* y *per<sup>L</sup>* [6].

Siguiendo estos trabajos, los científicos Hall y Rosbash aislaron y caracterizaron el gen *period* (gen *per*), aunque su estructura y secuencia no sugería inmediatamente un mecanismo molecular para el reloj circadiano [10].

Gracias al desarrollo de anticuerpos de la proteína que codificaba el gen *per* (proteína PER) fue posible observar que la abundancia de esta proteína en el cerebro de la mosca oscilaba en ciclos de 24h con máximo durante la noche. También el ARNm de este gen oscilaba de manera circadiana precediendo los ciclos de PER por varias horas, lo que indicaba que las oscilaciones de PER son el resultado de las oscilaciones del ARNm que la codifica (*per* ARNm) [10]. Este comportamiento sugirió que la proteína PER es un factor de transcripción que actúa como represor del propio gen *per*, pues una vez alcanzado el máximo en la concentración de *per* ARNm, aumenta la concentración de PER conforme se va sintetizando en el ribosoma, y conforme ésta aumenta, disminuye el ARNm debido a la acción represora de PER hasta alcanzar un mínimo en el momento en que PER es máximo (máxima acción represora). La baja concentración de ARNm hace que disminuya PER, y la concentración de ARNm puede subir nuevamente. Se trata de un ciclo de realimentación negativa, donde la acumulación de PER inhibe su propia transcripción y resulta en oscilaciones de la proteína y de su ARNm desfasadas en el tiempo.

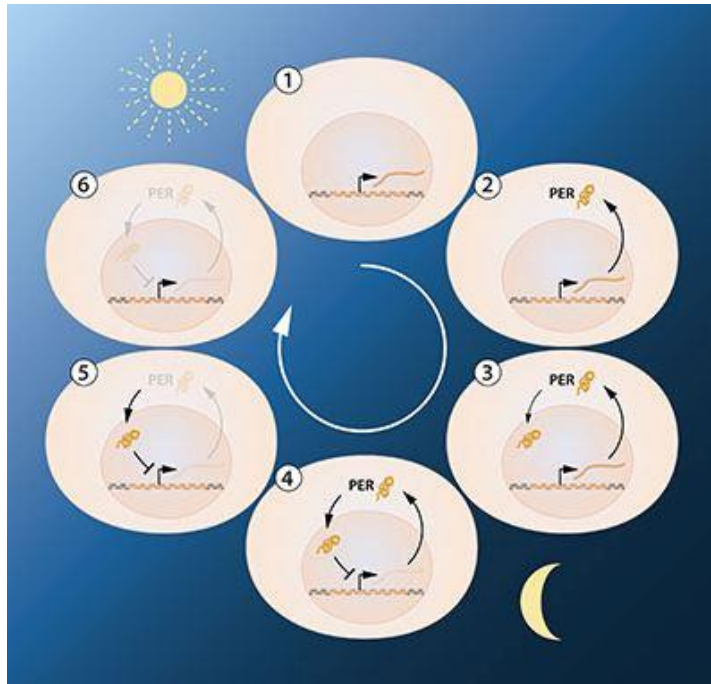


Figura 6: Ciclo de realimentación negativa del gen *period*. La proteína que codifica el gen *period* inhibe la transcripción del propio gen. La proteína *PER* se acumula durante la noche y se degrada durante el día. (1) Síntesis del ARNm en el núcleo (proceso de transcripción). (2) Síntesis de la proteína *PER* a partir de *per* ARNm (proceso de traducción). (3) Entrada de *PER* en el núcleo celular. (4) Represión del proceso de transcripción (disminución de la concentración de ARNm). (5) Disminución de la cantidad de *PER* en el citoplasma. (6) Disminución de la concentración de *PER* en el núcleo. Imagen tomada de [1].

Young identificó un segundo gen participante en el reloj circadiano, el gen *timeless*, cuyo ARNm (*tim* ARNm) se descubrió que también oscilaba en periodos de 24h. La proteína que codifica este gen, la proteína *TIM*, forma un complejo con la proteína *PER* (complejo *PER-TIM*), y mediante la formación de dicho complejo, se bloquea la degradación de *PER* y permite su entrada en el núcleo celular, donde debe estar para actuar como represor de la transcripción del gen *per*. Se observó que el ciclo de la expresión de *period* se suprimía en las moscas con mutación en *timeless*, y que los ciclos en la expresión de *timeless* se suprimían en las mutaciones de *period*. Lo que indica una necesaria interrelación de ambas proteínas para que tengan lugar las oscilaciones [10].

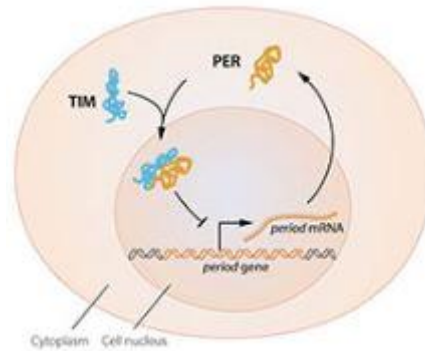


Figura 7: Ciclo de realimentación del gen *period* incluyendo la acción de la proteína TIM. La formación del complejo PER-TIM evita la degradación de PER y permite la entrada al núcleo de la misma, donde ejerce su acción represora de la transcripción. Imagen tomada de [10].

Un nuevo descubrimiento por Joseph Takahashi [19] ayudaría a clarificar el mecanismo que regula la transcripción genética de *period* y *timeless*, las proteínas CLOCK (CLK) y CYCLE (CYC). Estas proteínas son activadores de la transcripción de *period* y *timeless*, y el complejo PER-TIM actúa regulando negativamente la actividad de CLK.

Las reacciones de transcripción y traducción son relativamente rápidas. Sin embargo, para que se observen oscilaciones de 24 horas, se deben imponer retrasos sustanciales en el modelo. Dichos retrasos se consiguen introduciendo reacciones de fosforilación, degradación, formación de complejos proteicos y transporte al núcleo entre otras modificaciones postraduccionales [10].

Este retraso se introdujo en el mecanismo molecular gracias a un nuevo descubrimiento realizado por Young. Un nuevo gen llamado *doubletime* que sintetiza la enzima DBT (dibenzotiofeno) que actúa fosforilando PER e induciendo su degradación.

Los modelos moleculares actuales son más complejos e incluyen muchos otros componentes adicionales que colectivamente contribuyen a la robustez de sus oscilaciones y a la periodicidad circadiana. Además se incluyen proteínas que involucran comportamientos relacionados con el ambiente y ayudan al acoplamiento del reloj. Por ejemplo, la luz actúa activando una proteína llamada CRY (codificada por el gen *cryptochrome*) promoviendo su unión a TIM y favoreciendo su degradación. Bajo exposición a la luz, TIM se degrada por acción de CRY, quedando PER vulnerable a la fosforilación por DBT y su consecuente degradación [10].

## **II. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA**

### **II.1 Objetivos**

Comprender cómo se construyen modelos matemáticos basados en ecuaciones diferenciales no-lineales para simular ritmos circadianos en *Drosophila*, así como presentar distintos modelos matemáticos ya existentes de diferente complejidad, validez y utilidad, que pondremos de manifiesto.

### **II.2 Metodología y herramientas**

El presente trabajo se ha construido principalmente a partir de bibliografía referente a los ritmos circadianos en *Drosophila* y al modelado de ritmos biológicos. Ha sido una labor de búsqueda de artículos científicos pertinentes al tema y consulta de libros de distintas disciplinas, pues en este campo la física y las matemáticas van de la mano de la biología.

Otra parte del trabajo se ha basado en la simulación mediante código Matlab de los dos modelos más representativos de las oscilaciones circadianas en *Drosophila*. Los códigos utilizados para la simulación se encuentran anexos a este trabajo.

## **III. DESARROLLO DE LOS CONTENIDOS**

### **III.1 Biología computacional**

En las últimas décadas hemos vivido una rápida acumulación de datos sobre genes, proteínas y redes celulares. La necesidad del uso de biología computacional para dar sentido a las interacciones que intervienen en la regulación celular se ha visto cada vez más clara, pues para comprender los complejos mecanismos regulatorios, así como los mecanismos de coordinación celular a nivel de población, la intuición y los argumentos verbales por lo general son insuficientes. Los resultados aportados por la biología computacional con frecuencia resultan antintuitivos.

Aunque el sistema circadiano consiste en poblaciones de células acopladas y sincronizadas para generar oscilaciones estables, en este trabajo nos centraremos en modelos para oscilaciones que ocurren en células individuales.

Los modelos deben proporcionar un marco teórico capaz de explicar las observaciones experimentales y hacer predicciones que puedan ser comprobadas [5]. La traducción de los

modelos moleculares a modelos computacionales que permitan hacer simulaciones posibilita la comprobación de la validez del modelo, así como llevar a cabo predicciones que pueden encaminar la experimentación celular. Además, las simulaciones permiten determinar los efectos cualitativos y cuantitativos de cada parámetro y así reconocer los parámetros que más afectan a la dinámica del sistema.

A la hora de diseñar un modelo matemático hay ciertas cuestiones que necesariamente aparecen. Es el caso de determinar cuáles son los parámetros clave, el número y el tipo de ecuaciones a considerar y cómo elegir el valor de los parámetros de nuestro modelo. Las opciones dependen del modelo biológico que se esté siguiendo, pero por lo general quedan márgenes que hay que salvar mediante la experiencia y el gusto personal [11]. El resultado del modelado por lo general es un sistema de ecuaciones diferenciales en el que se expresa la variación con el tiempo de las distintas sustancias que intervienen en las reacciones químicas relacionadas con la producción de ritmos circadianos en el interior celular y en función de las constantes cinéticas de las distintas reacciones.

La mayoría de los modelos propuestos son de naturaleza determinista, de manera que una vez fijados parámetros y condiciones iniciales, la evolución del sistema es única y perfectamente predecible. Esto no va de acuerdo con la realidad, pues en las células reales existen varias fuentes de ruido que producen fluctuaciones en los parámetros. Las ecuaciones deterministas no son suficientes para abarcar el proceso en toda su complejidad y es necesario entrar en el campo de la física estadística. Se pueden utilizar aproximaciones estocásticas basadas en modelos probabilísticos para simular el ruido y tratar de asegurar la robustez de las oscilaciones en presencia de dichas fluctuaciones [11], aunque esto queda fuera del propósito de este trabajo.

Ninguno de los modelos que se presentarán a continuación tiene en cuenta el espacio y la difusión de los diferentes componentes de la célula. Únicamente se distingue entre dos compartimentos: citoplasma y núcleo. Las variables representan la concentración media de las proteínas o el ARNm en el interior de estos compartimentos.

En cualquier caso, los modelos computacionales y las simulaciones son una herramienta fundamental para explorar los fenómenos dinámicos en la célula y a nivel de población celular. Y en concreto los ritmos circadianos son un buen terreno para aplicar la biología computacional al estudio de oscilaciones asociadas a la regulación genética [5].

### III.2 Naturaleza de las oscilaciones

Antes de hacer un modelo matemático para simular las oscilaciones circadianas es conveniente reunir las características de estos ritmos para tratar de reproducir su naturaleza. Dichas características son:

- a) Existencia de un ritmo endógeno, de periodo cercano a 24 horas. En el estudio de los ritmos circadianos, se suele hacer la suposición implícita de que las manifestaciones fisiológicas circadianas de los organismos (que actúan en períodos de 24 horas) tienen la misma fase y periodo que el componente molecular del reloj circadiano [11].
- b) Acoplamiento y sincronización con el ciclo diario de luz.
- c) Persistencia de las oscilaciones en ausencia del ritmo de luz-oscuridad. Las oscilaciones autosostenidas persisten con periodo cercano a 24 horas en condiciones de iluminación constantes.
- d) Oscilaciones robustas, autosostenidas e independientes de las condiciones iniciales, para que el reloj soporte las pequeñas perturbaciones que se puedan producir con frecuencia en el entorno y siga funcionando.

Un buen modelo debería ser capaz además de contemplar la existencia de periodos similares a los encontrados en las moscas con mutaciones.

Otra herramienta que permite contrastar la validez del modelo son los diagramas de respuesta de fase. Las curvas de respuesta de fase muestran el signo y la amplitud del desplazamiento de fase que se produce al aplicar un pulso de luz al reloj circadiano (u otro tipo de estimulación química) en función del tiempo [11]. Estas curvas se han determinado experimentalmente para los ritmos circadianos de numerosos organismos, incluyendo *Drosophila* [20]. Los modelos permiten crear curvas de respuesta de fase teóricas que deben coincidir con las experimentales.

Las curvas de respuesta de fase se obtienen simulando un oscilador perturbado por un pulso de luz y comparando la fase de las curvas del oscilador perturbado con la de un oscilador idéntico sin perturbar [11].

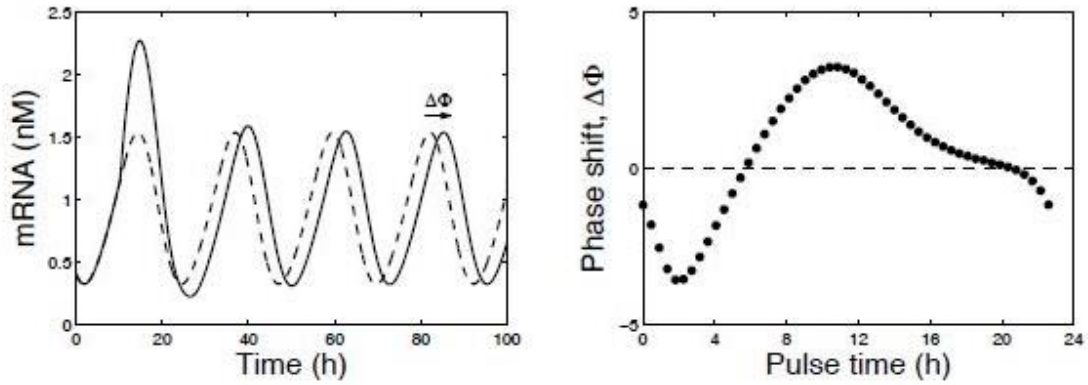


Figura 8: (izquierda) Desplazamiento de fase inducido por un pulso de luz. La línea discontinua corresponde al oscilador sin perturbar y la línea continua el oscilador perturbado por el pulso de luz. (Derecha) Curva de respuesta de fase. En esta gráfica se representa el desplazamiento de fase  $\Delta\phi$  frente al tiempo. Imagen tomada de [11].

Siguiendo los trabajos de Hall, Rosbash y Young, podemos incluir en la naturaleza de los ritmos circadianos el origen a partir de la realimentación negativa según un ciclo de transcripción-traducción.

### III.3 Herramientas del modelado

Para proporcionar un modelo con las características mencionadas en el apartado anterior, podríamos utilizar oscilaciones de tipo Lotka-Volterra, ya que éstas tienen la capacidad de acoplarse a una señal externa y de producir curvas de respuesta de fase comparables a los datos experimentales. Sin embargo, se trata de un oscilador lineal, estructuralmente inestable y cualquier perturbación pequeña modificaría su amplitud, no siendo un modelo válido para nuestro propósito [11].

Para lograr oscilaciones robustas y autosostenidas, que soporten pequeñas perturbaciones (estas son perturbaciones que modifiquen el valor de los parámetros dentro de órdenes de magnitud fisiológicos) necesitamos un modelo matemático que defina un sistema estructuralmente estable. La estabilidad estructural se define de la siguiente manera:

“Diremos que un sistema es estructuralmente estable para un determinado valor de los parámetros de control si pequeñas variaciones alrededor de ese valor no modifican cualitativamente el comportamiento del sistema, o lo que es lo mismo, el “retrato” que del sistema podemos hacer en el plano fásico se mantiene inalterado” [21].



El ciclo límite es una trayectoria periódica que cumple las condiciones de estabilidad estructural. En la representación en el espacio de fase (espacio definido por el conjunto de variables dependientes  $\{x_i\}$ ) la trayectoria periódica tendrá una forma de órbita cerrada. Por otro lado, una trayectoria correspondiente a un estado estacionario (recta paralela al tiempo) se vería en el espacio fase como un punto [21]. La estabilidad estructural del ciclo límite asegura que, tras pequeñas perturbaciones, el sistema vuelve a la trayectoria original [9]. La mayoría de modelos de relojes circadianos se basan en oscilaciones de tipo ciclo límite. Se caracterizan porque su amplitud y período son independientes de las condiciones iniciales y son constantes para un valor de los parámetros determinado [11].

La aparición de ciclos límite se basa en la no-linealidad del sistema, representando un sistema disipativo con necesidad de aporte continuo de energía [11]. La mayoría de los modelos utilizan una realimentación negativa que introduce la no-linealidad (proteína que reprime la expresión del gen que la codifica). Cuando simulamos el proceso de transcripción mediante una función de Hill y cuando aplicamos la cinética de Michaelis-Menten introducimos una no-linealidad suficiente para que ocurran ciclos límite.

El tipo de ecuaciones que resultan de introducir la función de Hill y la función de Michaelis-Menten no son resolubles analíticamente, pero los algoritmos de integración numérica han demostrado funcionar muy bien en este tipo de sistemas y proporcionar soluciones precisas. Es necesario, sin embargo, conocer el valor de los parámetros del sistema para llevar a cabo la integración [11].

Los parámetros que se utilizan en el modelado representan por lo general parámetros de la cinética química en la célula. Sin embargo, las velocidades de reacción y constantes de equilibrio químico son rara vez determinables experimentalmente [11] y suele ser de interés explorar el comportamiento del sistema para diferentes valores de los parámetros, pues la dinámica del sistema puede cambiar si cambia el valor de los parámetros en juego. No obstante, la arquitectura de las ecuaciones favorece la aparición de ciclos límite y no es posible obtener cualquier comportamiento arbitrario modificando únicamente el valor de los parámetros.

Para conocer la dinámica del sistema en función de un parámetro de control se utilizan diagramas de bifurcación. Estos diagramas muestran la amplitud o el período de las oscilaciones en función del valor del parámetro de control. Se construyen numéricamente resolviendo las ecuaciones para los diferentes valores del parámetro de control y reteniendo

el valor máximo y mínimo de una variable. Si el sistema converge a un punto de equilibrio, los valores máximo y mínimo de la variable serán iguales y en el diagrama se dibujará un solo punto. Mientras que cuando se producen oscilaciones aparecen dos curvas: una con el valor máximo y otra con el mínimo. La forma de estos diagramas no depende únicamente de la arquitectura de las ecuaciones involucradas, sino que también influye el valor de los otros parámetros. Esto hace que sean difíciles de predecir intuitivamente. Sin embargo, son una herramienta muy útil para saber qué rango de valores debe tener un parámetro para que se produzcan ciclos límite y qué periodo tendrán las oscilaciones resultantes para un valor determinado del parámetro [11].

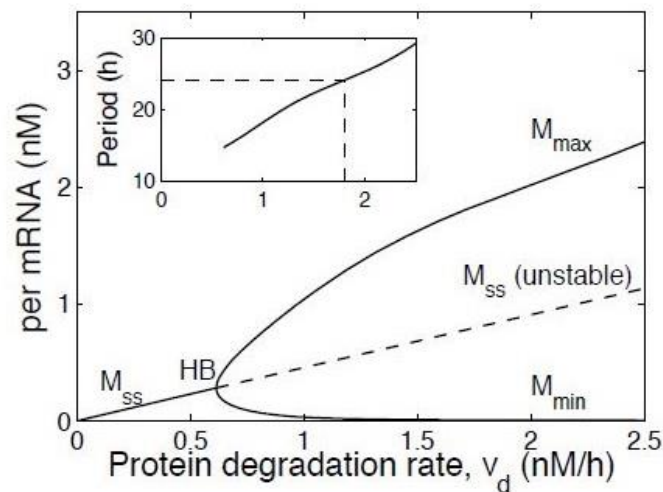


Figura 9: Ejemplo de diagrama de bifurcación para las oscilaciones de per ARNm en función del parámetro de control  $v_d$ . Para valores bajos de  $v_d$  el sistema presenta un estado estacionario estable, pero a partir del valor crítico (HB) cambia la dinámica del sistema y aparecen oscilaciones autosostenidas con los valores máximos y mínimos marcados como  $M_{max}$  y  $M_{min}$ . Este estado coexiste con un estado estacionario que es inestable (representado con línea discontinua). Imagen tomada de [11].

Así, los diagramas de bifurcación permiten estudiar el efecto de ciertas mutaciones sobre parámetros celulares. Supongamos una mutación que acorta el periodo de las oscilaciones haciendo que éstas sean de 19 horas (mutación *per<sup>s</sup>*). Con un diagrama de bifurcación que muestre el periodo de las oscilaciones en función de un parámetro del modelo que represente un parámetro celular (una velocidad de reacción, por ejemplo), podemos ver si variando ese parámetro se pueden obtener oscilaciones con periodo de 19 horas. En caso de que no sea posible (y suponiendo válido el modelo) se puede descartar que la mutación afecte a dicho parámetro. En caso contrario se puede saber qué valor concreto debe tener dicho parámetro para que las oscilaciones sean del periodo deseado y tener en cuenta que es posible que la

mutación afecte alterando ese parámetro.

El conjunto de parámetros que se elegirá debe dar lugar a un modelo que satisfaga las observaciones experimentales en cuanto a periodo y amplitud de las oscilaciones, relaciones de fase, efecto de ciertas mutaciones (en caso de que sepamos los parámetros afectados por la mutación), su capacidad de acoplarse al ciclo de luz-oscuridad y su curva de respuesta de fase. Además, los parámetros deben tener magnitudes coherentes con la fisiología de la mosca [11].

Para seleccionar el mejor conjunto de parámetros o para discriminar entre diferentes modelos, existen análisis de sensibilidad que pueden medir el impacto de los cambios en los parámetros. Así, los parámetros que menos impacto provoquen ante pequeños cambios serán los más adecuados [11].

Antes de ser conocidos los detalles de los mecanismos moleculares de los ritmos circadianos, se aplicaron modelos tomados directamente de la física para investigar sus propiedades dinámicas. Es el caso del oscilador de Van der Pol [5].

### **III.4 Modelos**

#### *III.4.1 Oscilador de Van der Pol*

El oscilador de Van der Pol describe un sistema dinámico no lineal. Es un oscilador no conservativo donde la energía es disipada para amplitudes grandes y generada para amplitudes pequeñas. Se forma un ciclo límite como resultado del equilibrio entre la generación y disipación de energía, donde ocurren oscilaciones en torno a dicho estado de equilibrio [22].

La ecuación que describe el oscilador de Van der Pol es la siguiente [21]:

$$\ddot{x} - \epsilon(1 - x^2)\dot{x} + \omega_0^2 x = 0$$

La no linealidad se introduce con el término  $\epsilon(1 - x^2)$ . Si  $\epsilon = 0$  la ecuación resultante sería la del oscilador armónico lineal.

La ecuación puede ser expresada de forma equivalente en el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\dot{x} = y$$

$$\dot{y} = \epsilon(1 - x^2)y - \omega_0^2 x$$

Este sistema presenta una única solución estacionaria, el punto  $(0,0)$ . Para  $0 < \epsilon \ll 1$ , es decir, cuando el sistema es sólo “ligeramente no lineal”, la estabilidad de esta solución se puede resolver analíticamente, y se observa que es un foco inestable. Así, este punto actúa como repulsor haciendo que las trayectorias que parten de él tiendan en espiral hacia un ciclo límite que es estable, cuya frecuencia de oscilación es aproximadamente  $\omega_0$  [21]. Las trayectorias que parten desde puntos exteriores al ciclo límite también tienden a decaer a éste [22].

Si el sistema se ve forzado por una función periódica se obtiene:

$$\ddot{x} - \epsilon(1 - x^2)\dot{x} + \omega_0^2 x = \alpha \cos(\omega_1 t)$$

El estudio dinámico del nuevo sistema en función de  $\alpha$  y  $\omega_1$  se hace a partir de un diagrama de bifurcación bidimensional o diagrama de fases, en el que se varían estos dos parámetros y el resto se mantiene constante. En el diagrama se observan las distintas zonas de acoplamiento de fase o sincronización, esto es, cuando el oscilador autónomo de frecuencia natural ( $\omega_0$ ) es perturbado con un ritmo periódico de frecuencia externa o de perturbación ( $\omega_1$ ) y se obtiene un comportamiento oscilatorio de frecuencia igual a la de la perturbación, múltiplos o submúltiplos de ella.

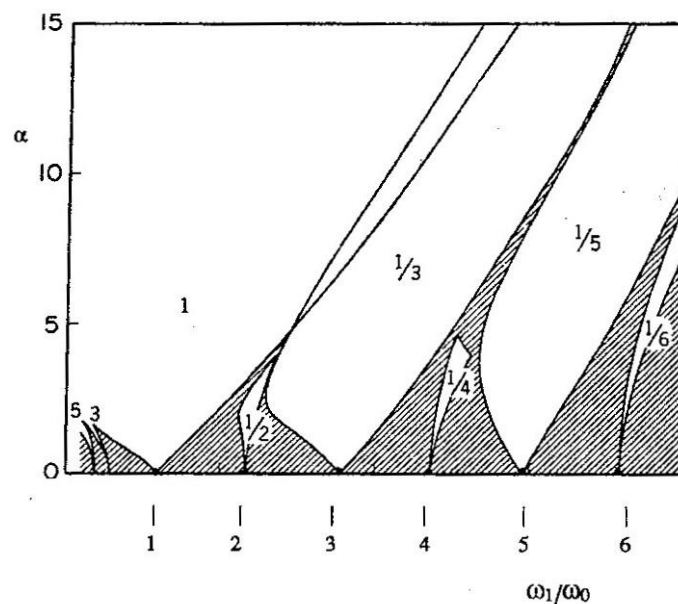


Figura 10: Diagrama de bifurcación que muestra las regiones de acoplamiento de fase de un oscilador de Van der Pol forzado por una perturbación sinusoidal. Los números indican la relación entre la frecuencia resultante del oscilador y la frecuencia de la perturbación. En las zonas sombreadas no se observa acoplamiento. Imagen tomada de [21].

Las ecuaciones de Van der Pol están derivadas de un oscilador eléctrico. Sin embargo, son capaces de modelar la resonancia del reloj circadiano con el ciclo externo de luz-oscuridad [5].

En un oscilador circadiano que siga este modelo, las variables y los parámetros no están asociados directamente a componentes moleculares. Es un modelo fenomenológico que, con algunas adaptaciones, puede conseguir periodos de 24 horas y dar cuenta del efecto sincronizante de la luz.

La relativa simplicidad de estos modelos hace que todavía se utilicen hoy día para estudiar propiedades genéricas de las oscilaciones circadianas [11].

En 2003, los científicos Kunz y Achermann utilizaron este modelo para estudiar la sincronización de una población de osciladores circadianos, tomando como base el modelo de 1980 de Kronauer [23] para el oscilador circadiano de los mamíferos, el cual se basa en el oscilador de Van der Pol. Dicho modelo viene dado por las siguientes ecuaciones [24]:

$$\frac{12}{\pi} \dot{x} = y + \epsilon \left( x - \frac{4}{3} x^3 \right) + B$$

$$\frac{12}{\pi} \dot{y} = - \left( \frac{24}{\tau} \right)^2 x + By$$

$x$  e  $y$  son las variables de estado del oscilador, donde  $x$  representa el ritmo circadiano endógeno;  $\tau$  representa el periodo intrínseco del oscilador; y la luz externa que marca el ritmo de las oscilaciones se introduce a través del factor  $B$  (*perceived brightness*) [24].

#### III.4.2 Oscilador Goodwin

En 1965 Brian C. Goodwin [25] propuso un modelo genérico para oscilaciones biomoleculares. Fue el primero en predecir las oscilaciones debidas a la realimentación negativa en la expresión genética, antes de conocer el papel que este mecanismo regulatorio jugaba en la producción de oscilaciones circadianas [5].

Su modelo está basado en una cadena de tres reacciones sucesivas en la que el producto final inhibe la producción del primer producto ( $X \rightarrow Y \rightarrow Z \dashv X$ ) [11]. El resultado es un bucle de realimentación negativa retardada que se expresa mediante tres ecuaciones diferenciales con tres variables:

$$\frac{dX}{dt} = k_1 \frac{K_I^n}{K_I^n + Z^n} - k_4 X$$

$$\frac{dY}{dt} = k_2 X - k_5 Y$$

$$\frac{dZ}{dt} = k_3 Y - k_6 Z$$

La función de Hill represora introduce la no linealidad, que está medida por el valor del coeficiente de Hill. Griffith [26] demostró que esta no linealidad es suficiente para producir oscilaciones autosostenidas [11]. Las ecuaciones presentan además un término negativo de degradación caracterizado por las constantes  $k_4$ ,  $k_5$  y  $k_6$ . Este término es necesario para que las concentraciones no crezcan infinitamente pues lo que se busca son oscilaciones y para ello, las concentraciones, además de crecer, también deben decrecer.

La simplicidad de este modelo permite un estudio analítico de las ecuaciones, las cuales se pueden expresar de la siguiente forma genérica:

$$\frac{dX_1}{dt} = \frac{c}{1 + \alpha X_{N+1}^\rho} - k_1 X_1$$

$$\frac{dX_i}{dt} = k_{i-1} X_{i-1} - k_i X_i \quad (i = 2, \dots, N + 1)$$

Las ecuaciones anteriores producen ciclos límite si  $N \geq 2$  y  $\rho \geq 2$ . Aumentando el número de pasos intermedios (retardo en el ciclo), el comportamiento oscilatorio se da para  $\rho$  relativamente pequeño. Sin embargo, para  $N = 2$  se tiene que cumplir que  $\rho \geq 8$  para encontrar soluciones periódicas [27].

Cuando se encontraron las primeras evidencias de que las oscilaciones circadianas tenían como origen un ciclo de transcripción-traducción con realimentación negativa en *Drosophila*, Ruoff et al. [28] reinterpretaron el modelo de Goodwin de la siguiente manera: la variable X representa la concentración del ARNm del gen responsable de los ritmos circadianos (gen *per*); el ARNm se traduce a una proteína cuya concentración viene dada por la variable Y; esta proteína activa la producción de una proteína represora de la transcripción genética, siendo Z la concentración de dicha proteína ( $X, Y, Z \rightarrow [ARNm], [P], [P_N]$ ) [11].

Este modelo y sus variantes se utilizan hoy día como un modelo simple para describir las propiedades fundamentales que subyacen en los osciladores circadianos de forma general y

para estudiar la sincronización de un grupo de osciladores circadianos acoplados [11]. En estos casos es importante tener oscilaciones circadianas, pero los detalles moleculares no son relevantes.

Por otro lado, si estamos interesados en estudiar la relación entre el mecanismo circadiano y la curva de respuesta de fase o el efecto de una mutación en concreto sobre las oscilaciones, entonces es necesario un modelo detallado que describa explícitamente el efecto de la luz o los parámetros relacionados con la mutación.

#### *III.4.3 Modelo de Goldbeter 1995*

Este modelo es posterior a los estudios de Hall y Rosbash. Se conocía el papel de la proteína PER y su actuación como represor en el núcleo. Se trata de un modelo molecular de reloj circadiano mínimo, en el que se pretende reproducir únicamente las oscilaciones endógenas, sin tener en cuenta el efecto de la luz.

El modelo, al igual que el modelo de Goodwin, incluye la realimentación negativa ejercida por la proteína PER, pero además introduce fosforilaciones múltiples de esta proteína, siendo necesario un estado de doble fosforilación para que ésta pueda entrar en el núcleo. Así, el ciclo (que se muestra en la figura 11) transcurre de la siguiente manera: el *per* ARNm se sintetiza en el núcleo mediante la transcripción y es trasladado al citoplasma. En el citoplasma se degrada mediante una reacción enzimática de velocidad máxima  $v_m$  y tiene lugar la síntesis de proteína PER ( $P_0$ ) mediante el proceso de traducción. A continuación tienen lugar sucesivas fosforilaciones y desfosforilaciones (el modelo contempla dos por considerarlas suficiente para los propósitos dinámicos del sistema, aunque podrían ser más) que ocurren por reacciones enzimáticas.  $P_0$ ,  $P_1$ , y  $P_2$  corresponden respectivamente a los estados no fosforilado, primera fosforilación y segunda fosforilación. El estado doblemente fosforilado se degrada por acción de enzimas con una velocidad máxima  $v_d$ . El siguiente paso es la entrada en el núcleo de la proteína doblemente fosforilada (donde pasa a llamarse  $P_N$ ). La salida de proteína del núcleo al citoplasma también es posible y viene regulada por la constante  $k_2$ . En el núcleo, la proteína ( $P_N$ ) reprime la transcripción génica e introduce la realimentación negativa [29].

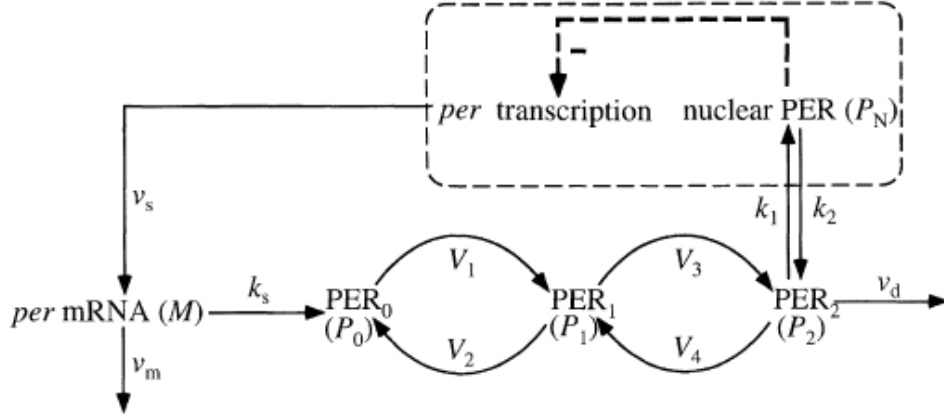


Figura 11: Esquema del modelo para oscilaciones circadianas de PER y per ARNm. El per ARNm se sintetiza en el núcleo y es trasladado al citoplasma, donde se acumula con una velocidad máxima  $v_s$ . En el citoplasma se degrada mediante una reacción enzimática de velocidad máxima  $v_m$  y constante de Michaelis  $K_m$ . El proceso de traducción transcurre sintetizando PER con una tasa proporcional a  $[ARNm]$  regulada por la constante  $k_s$ ; Las sucesivas fosforilaciones y desfosforilaciones de la proteína ocurren a las velocidades máximas  $V_i$  por reacciones enzimáticas con constantes de Michaelis  $K_i$  ( $i = 1, \dots, 4$ ). El estado doblemente fosforilado ( $P_2$ ) se degrada siguiendo la velocidad máxima  $v_d$  y la constante de Michaelis  $K_d$ . La entrada en el núcleo de la proteína doblemente fosforilada transcurre a una velocidad regulada por una constante de proporcionalidad  $k_1$  y la velocidad de salida de  $P_N$  al citoplasma viene regulada por la constante  $k_2$ . En el núcleo la proteína reprime la transcripción que viene descrita por una función de Hill con coeficiente de Hill  $n$  y  $K_I$  como constante de represión. Imagen tomada de [29].

El esquema de la figura se traduce en las siguientes ecuaciones [29]:

$$\begin{aligned} \frac{d[ARNm]}{dt} &= v_s \frac{K_I^n}{K_I^n + [P_N]^n} - v_m \frac{[ARNm]}{K_m + [ARNm]} \\ \frac{d[P_0]}{dt} &= k_s [ARNm] - V_1 \frac{[P_0]}{K_1 + [P_0]} + V_2 \frac{[P_1]}{K_2 + [P_1]} \\ \frac{d[P_1]}{dt} &= V_1 \frac{[P_0]}{K_1 + [P_0]} - V_2 \frac{[P_1]}{K_2 + [P_1]} - V_3 \frac{[P_1]}{K_3 + [P_1]} + V_4 \frac{[P_2]}{K_4 + [P_2]} \\ \frac{d[P_2]}{dt} &= V_3 \frac{[P_1]}{K_3 + [P_1]} - V_4 \frac{[P_2]}{K_4 + [P_2]} - k_1 [P_2] + k_2 [P_N] - v_d \frac{[P_2]}{K_d + [P_2]} \\ \frac{d[P_N]}{dt} &= k_1 [P_2] - k_2 [P_N] \end{aligned}$$

La cantidad total de proteína PER viene dada por:

$$[P_t] = [P_0] + [P_1] + [P_2] + [P_N]$$



Resolviendo el sistema de ecuaciones anterior por análisis numérico (el código utilizado se puede ver en el anexo I) obtenemos lo siguiente:

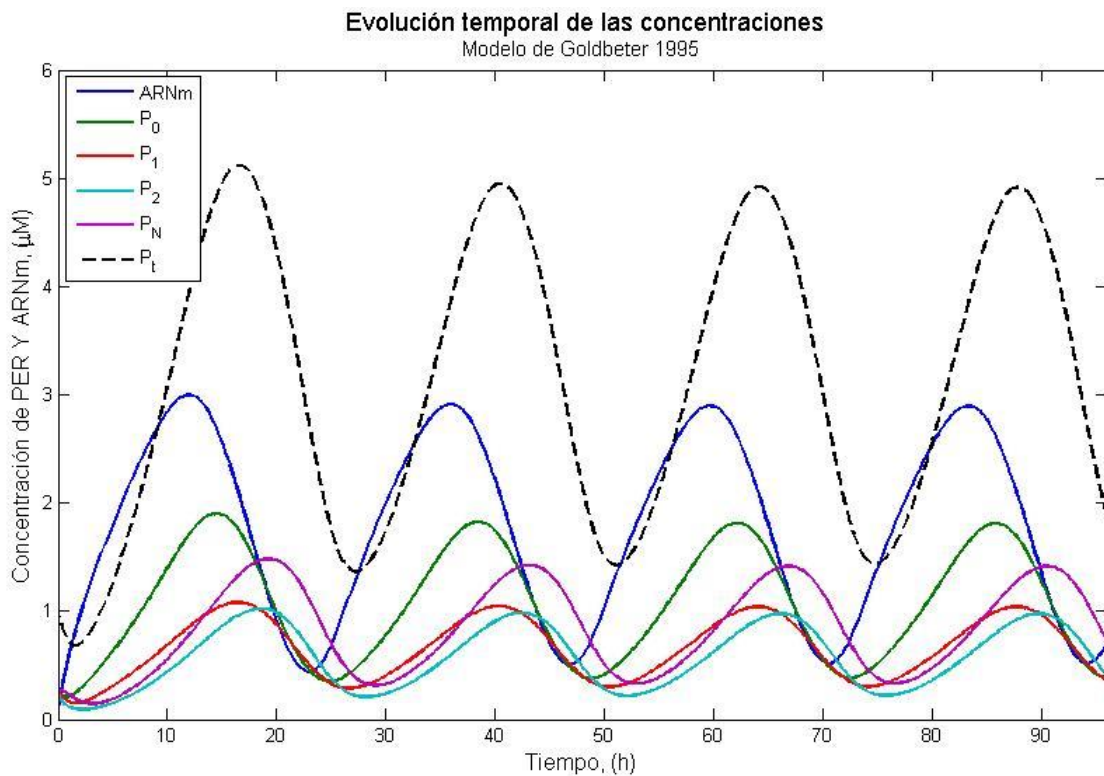


Figura 12: Solución a las ecuaciones del modelo de Goldbeter de 1995. En la evolución temporal de las concentraciones se muestran las oscilaciones autosostenidas que se generan en el modelo. En esta representación se observa que la oscilación de la proteína PER y ARNm tienen periodos de 24 horas. Además se observa que las fosforilaciones introducen un retraso temporal. Los valores de los parámetros del modelo están tomados de [29] y son:  $v_s = 0,76 \mu M h^{-1}$ ,  $v_m = 0,65 \mu M h^{-1}$ ,  $K_m = 0,5 \mu M$ ,  $k_s = 0,38 h^{-1}$ ,  $v_d = 0,95 \mu M h^{-1}$ ,  $k_1 = 1,9 h^{-1}$ ,  $k_2 = 1,3 h^{-1}$ ,  $K_l = 1 \mu M$ ,  $K_d = 0,2 \mu M$ ,  $n = 4$ ,  $K_1 = K_2 = K_3 = K_4 = 2 \mu M$ ,  $V_1 = 3,2 \mu M h^{-1}$ ,  $V_2 = 1,58 \mu M h^{-1}$ ,  $V_3 = 5 \mu M h^{-1}$ ,  $V_4 = 2,5 \mu M h^{-1}$ . La unidad de concentración es tomada por A. Goldbeter en  $\mu M$  de manera arbitraria. Imagen de elaboración propia.

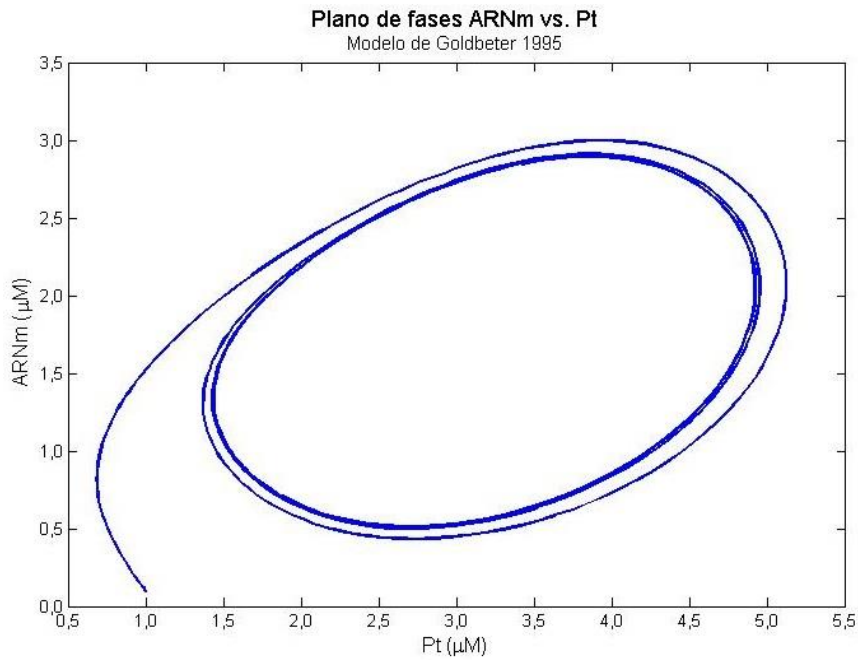


Figura 13: Representación en el plano de fases. Se observa la evolución hacia un ciclo límite y la naturaleza determinista del modelo. Las condiciones iniciales tomadas son:  $ARNm = 0,1 \mu M$ ,  $P_0 = P_1 = P_2 = P_N = 0,25 \mu M$ ,  $P_t = 1 \mu M$ . Imagen de elaboración propia.

La resolución del sistema de ecuaciones nos devuelve oscilaciones correspondientes a la evolución hacia un ciclo límite. Se observa también que los máximos de *per* ARNm tienen lugar varias horas antes que los máximos en la proteína PER total, como era de esperar de acuerdo a los experimentos. Esto apoya la idea de que el retardo en el tiempo que introducen las fosforilaciones múltiples fortalece la capacidad de producir oscilaciones mediante la realimentación negativa [29].

La robustez del modelo se ha probado introduciendo variaciones en los parámetros de  $\pm 5\%$ , y su variación en el periodo es como máximo de  $\pm 2,7\%$  [29].

El modelo predice que las oscilaciones autosostenidas ocurren en un rango acotado por dos valores críticos de la tasa de degradación  $v_d$ , siendo éste un parámetro clave del modelo. Se ha hecho un diagrama de bifurcación en período tomando  $v_d$  como parámetro de control, y en él se muestra cómo variaciones en este parámetro podrían explicar las diferentes mutaciones con período alterado ( $per^T$ ,  $per^S$ ,  $per^+$ ,  $per^L$ ). Es posible que estas mutaciones afecten a la estructura de la proteína PER haciéndola más vulnerable (aumenta la tasa de degradación) o resistente (disminuyendo la tasa de degradación) a la degradación por enzimas, lo que se resultaría en períodos más largos (en el caso de  $v_d$  alta) o cortos (en el caso de  $v_d$  baja).

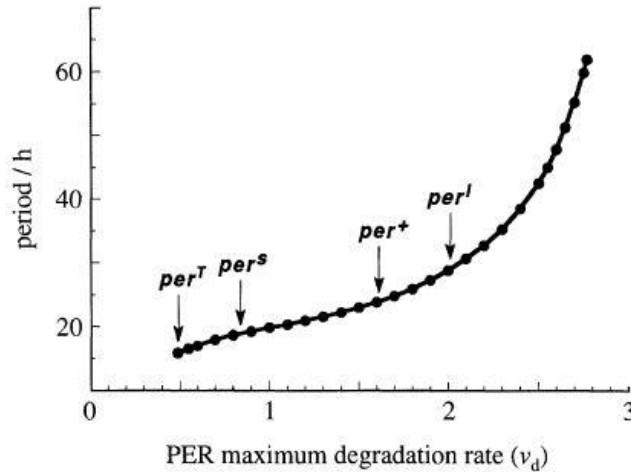


Figura 14: Diagrama de bifurcación en periodo del parámetro  $v_d$ . Variaciones en  $v_d$  explicarían las mutaciones  $per^T$  (llamada mutación de periodo ultracorto, con periodo cercano a 16 horas),  $per^S$  (periodo en torno a 19 horas),  $per^+$  (*Drosophila* de tipo salvaje (Wild type), periodo de 24 horas) y  $per^-$  (periodo de 28 horas). Imagen tomada de [29].

Además de cambios en  $v_d$  (o en lugar de ellos), variaciones en otros parámetros bioquímicos podrían provocar los cambios observados por las mutaciones. Por ejemplo, la constante de velocidad  $k_1$ , al controlar el transporte al núcleo, es otro parámetro clave del modelo, y existe, al igual que en  $v_d$ , un rango de valores en el que se producen oscilaciones autosostenidas. El período de las oscilaciones decrece conforme  $k_1$  aumenta [29].

Este modelo presenta notables mejoras respecto al modelo de Goodwin. Al introducir retrasos temporales mediante las fosforilaciones y la entrada controlada de proteína al núcleo, el dominio de parámetros en el que ocurren oscilaciones autosostenidas se alarga y permiten obtener valores circadianos del periodo. Estas características se ven favorecidas de igual manera aumentando el coeficiente de Hill de la realimentación negativa y también aumentando el número de fosforilaciones en la cadena [29].

#### III.4.4 Modelo de Leloup y Goldbeter 1998

Este modelo supone una extensión del anterior. En él se introduce el gen descubierto por Young, *timeless*, que actúa regulando la resistencia de PER a ser degradada. La proteína sintetizada por el gen *tim* (la proteína TIM) se degrada a mayor velocidad bajo efecto de la luz [20], lo que permite explicar el acoplamiento de los ritmos circadianos a los ciclos de luz-oscuridad externos.

En este modelo, la proteína TIM así como la proteína PER, se transcriben, traducen y fosforilan de forma análoga al modelo anterior. En este modelo, las formas bifosforiladas de PER y TIM ( $P_2$ ,  $T_2$ ) se unen formando un complejo C. Sólo cuando el complejo está formado puede entrar en el núcleo, donde pasa a llamarse  $C_N$ . Es este complejo el que actúa de represor de la transcripción de los genes *per* y *tim*. Todas las formas de las proteínas, complejos y ARNm incluyen en el modelo un término de degradación lineal. A su vez, las formas bifosforiladas de PER y TIM incluyen además un término de degradación por enzimas siguiendo la cinética de Michaelis-Menten. Dado que las evidencias experimentales indican una degradación más rápida de TIM bajo efecto de la luz, la variación del valor de la velocidad máxima de degradación de  $T_2$  por enzimas ( $v_{dT}$ ) solidariamente con la luz, permite introducir el acoplamiento a la señal luminosa externa. Los autores del modelo asignan un valor a  $v_{dT}$  que bajo efecto de la luz es el doble que en oscuridad.

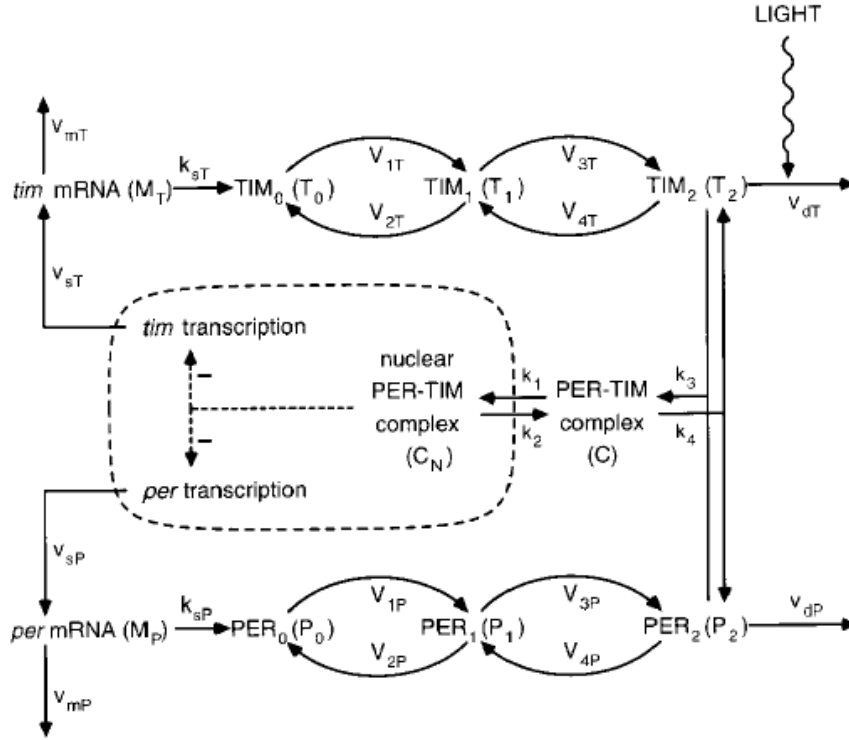


Figura 15: Esquema del modelo de Leloup y Goldbeter 1998 para oscilaciones circadianas en *Drosophila* con realimentación negativa ejercida por PER y TIM. *per* ARNm y *tim* ARNm se sintetizan en el núcleo y se transportan al citoplasma, donde se acumulan a velocidades máximas  $v_{sP}$  y  $v_{sT}$ . En el citoplasma se degradan por acción de enzimas a velocidades máximas  $v_{mP}$  y  $v_{mT}$  con constantes de Michaelis  $K_{mP}$  y  $K_{mT}$ . Las velocidades de síntesis de PER y TIM son proporcionales a [*per* ARNm] ( $M_p$ ) y [*tim* ARNm] ( $M_T$ ) por las constantes de velocidad  $k_{sP}$  y  $k_{sT}$ . Las fosforilaciones reversibles de  $P_0$  ( $T_0$ ) a  $P_1$  ( $T_1$ ) y  $P_1$  ( $T_1$ ) a  $P_2$  ( $T_2$ ) vienen descritas por las ecuaciones de Michaelis con velocidades máximas  $V_{iP}$  ( $V_{iT}$ ) y constantes de Michaelis  $K_{iP}$  ( $K_{iT}$ ) ( $i = 1, \dots, 4$ ). Las formas doblamente fosforiladas de las proteínas ( $P_2$  y  $T_2$ ) se degradan por reacciones enzimáticas a velocidades máximas  $v_{dP}$  y  $v_{dT}$  con constantes de Michaelis  $K_{dP}$  y  $K_{dT}$ . Estas proteínas en estado bifosforilado forman un complejo C de manera reversible, siendo las constantes de asociación y disociación  $k_3$  y  $k_4$ . El complejo migra al núcleo de manera regulada por la constante  $k_1$ . La salida del complejo nuclear ( $C_N$ ) al citoplasma está regulada por la constante  $k_2$ . La realimentación negativa que ejerce el complejo nuclear PER-TIM ( $C_N$ ) en el proceso de transcripción de los genes *per* y *tim* se expresa con una función de Hill decreciente con coeficiente de Hill  $n$  y constantes de represión  $K_{iP}$  y  $K_{iT}$ . Imagen tomada de [20].

El modelo consta de diez variables y diez ecuaciones [20]:

$$\frac{d[M_p]}{dt} = v_{sP} \frac{K_{iP}^n}{K_{iP}^n + [C_N]^n} - v_{mP} \frac{[M_p]}{K_{mP} + [M_p]} - k_d[M_p]$$

$$\frac{d[P_0]}{dt} = k_{sP}[M_p] - V_{1P} \frac{[P_0]}{K_{1P} + [P_0]} + V_{2P} \frac{[P_1]}{K_{2P} + [P_1]} - k_d[P_0]$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = V_{1P} \frac{[P_0]}{K_{1P} + [P_0]} - V_{2P} \frac{[P_1]}{K_{2P} + [P_1]} - V_{3P} \frac{[P_1]}{K_{3P} + [P_1]} + V_{4P} \frac{[P_2]}{K_{4P} + [P_2]} - k_d[P_1]$$

$$\frac{d[P_2]}{dt} = V_{3P} \frac{[P_1]}{K_{3P} + [P_1]} - V_{4P} \frac{[P_2]}{K_{4P} + [P_2]} - k_3[P_2][T_2] + k_4[C] - v_{dP} \frac{[P_2]}{K_{dP} + [P_2]} - k_d[P_2]$$

$$\frac{d[M_T]}{dt} = v_{sT} \frac{K_{IT}^n}{K_{IT}^n + [C_N]^n} - v_{mT} \frac{[M_T]}{K_{mT} + [M_T]} - k_d[M_T]$$

$$\frac{d[T_0]}{dt} = k_{sT}[M_T] - V_{1T} \frac{[T_0]}{K_{1T} + [T_0]} + V_{2T} \frac{[T_1]}{K_{2T} + [T_1]} - k_d[T_0]$$

$$\frac{d[T_1]}{dt} = V_{1T} \frac{[T_0]}{K_{1T} + [T_0]} - V_{2T} \frac{[T_1]}{K_{2T} + [T_1]} - V_{3T} \frac{[T_1]}{K_{3T} + [T_1]} + V_{4T} \frac{[T_2]}{K_{4T} + [T_2]} - k_d[T_1]$$

$$\frac{d[T_2]}{dt} = V_{3T} \frac{[T_1]}{K_{3T} + [T_1]} - V_{4T} \frac{[T_2]}{K_{4T} + [T_2]} - k_3[P_2][T_2] + k_4[C] - v_{dT} \frac{[T_2]}{K_{dT} + [T_2]} - k_d[T_2]$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_3[P_2][T_2] - k_4[C] - k_1[C] + k_2[C_N] - k_{dC}[C]$$

$$\frac{d[C_N]}{dt} = k_1[C] - k_2[C_N] - k_{dN}[C_N]$$

Las cantidades totales de proteína PER y TIM vienen dadas por:

$$[P_t] = [P_0] + [P_1] + [P_2] + [C] + [C_N]$$

$$[T_t] = [T_0] + [T_1] + [T_2] + [C] + [C_N]$$

En primer lugar estudiaremos el comportamiento dinámico del modelo en condiciones de iluminación constante. Esto es, cuando el valor de  $v_{dT}$  es constante e igual a  $2 \text{ nM h}^{-1}$ . Los demás parámetros los consideramos iguales para PER y TIM (por ejemplo  $V_{1T} = V_{1P}$ ;  $V_{2T} = V_{2P}$ ; ...). Podemos decir que los procesos que involucran a ambas proteínas por separado son simétricos.

Resolvemos el sistema de ecuaciones diferenciales utilizando el código que se presenta en el anexo III.

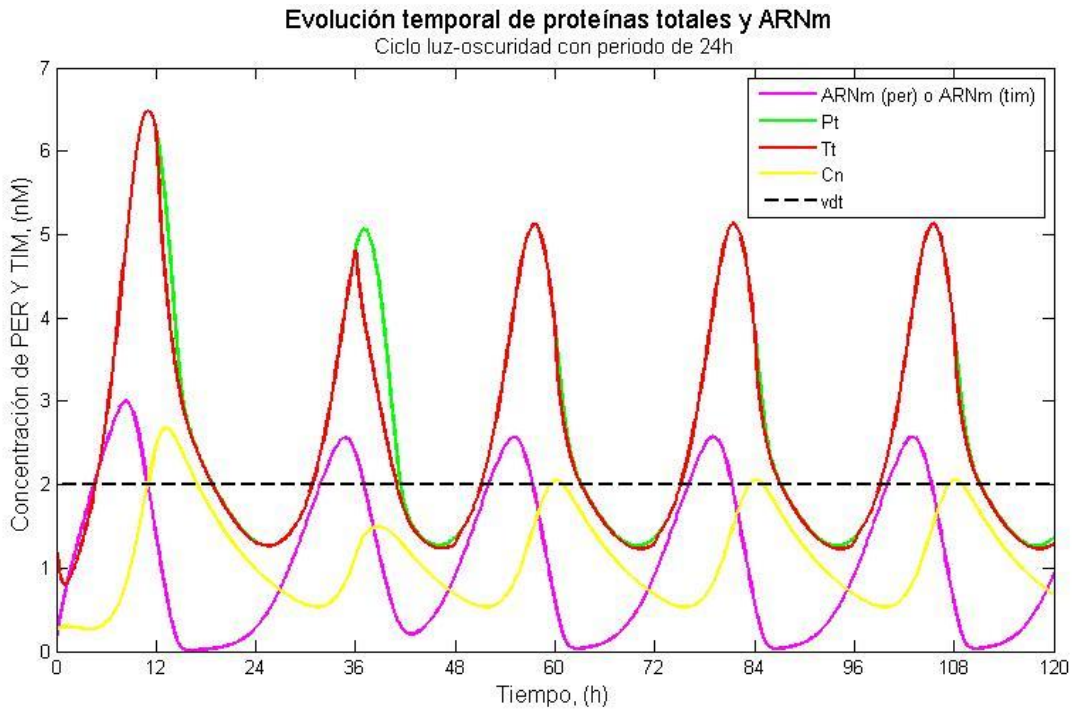


Figura 16: Oscilaciones en la concentración de la proteína total PER y TIM ( $P_t$  y  $T_t$ , cuyas curvas coinciden por la simetría de los parámetros del modelo), per ARNm y tim ARNm (que también coinciden), y la cantidad de complejo PER-TIM total existente en el núcleo. La línea discontinua representa el valor de  $v_{dT}$  que es continuo e igual a  $v_{dT} = 2 \text{ nMh}^{-1}$  en el caso de oscuridad permanente. Los resultados son similares al modelo de Goldbeter 1995, con oscilaciones en periodos de 24 horas. El valor de los parámetros utilizados son los del modelo de Leloup y Goldbeter 1998:  $v_{sP} = v_{sT} = 1 \text{ nMh}^{-1}$ ,  $v_{mP} = v_{mT} = 0,7 \text{ nMh}^{-1}$ ,  $K_{mP} = K_{mT} = 0,2 \text{ nM}$ ,  $k_{sP} = k_{sT} = 0,9 \text{ h}^{-1}$ ,  $v_{dP} = v_{dT} = 2 \text{ nMh}^{-1}$ ,  $k_1 = 0,6 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_3 = 1,2 \text{ (nMh)}^{-1}$ ,  $k_4 = 0,6 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_{IP} = K_{IT} = 1 \text{ nM}$ ,  $K_{dP} = K_{dT} = 0,2 \text{ nM}$ ,  $n = 4$ ,  $k_{dN} = k_{dC} = k_d = 0,01 \text{ h}^{-1}$ ,  $V_{1P} = V_{1T} = 8 \text{ nMh}^{-1}$ ,  $V_{2P} = V_{2T} = 1 \text{ nMh}^{-1}$ ,  $V_{3P} = V_{3T} = 8 \text{ nMh}^{-1}$ ,  $V_{4P} = V_{4T} = 1 \text{ nMh}^{-1}$ . Imagen de elaboración propia.

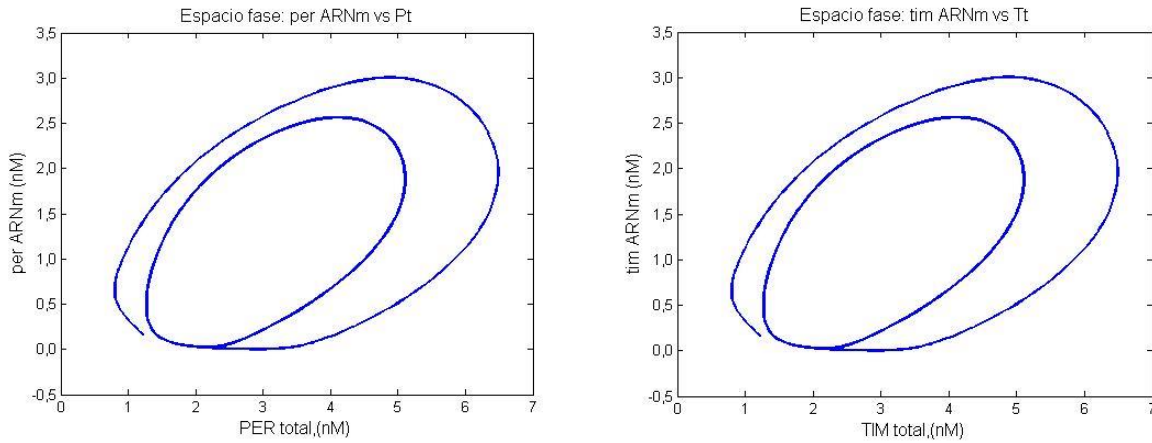


Figura 17: Representación en el espacio de fase de la concentración de *per* y *tim* ARNm frente a la proteína total de PER y TIM ( $P_t$  y  $T_t$ ). Se aprecia la evolución hacia un ciclo límite. Los valores iniciales utilizados para la integración son:  $P_0 = P_1 = P_2 = T_0 = T_1 = T_2 = C = C_N = 0,25 \text{ nM}$ ,  $M_P = M_T = 0,15 \text{ nM}$ . Imagen de elaboración propia.

El modelo muestra que la formación del complejo PER-TIM favorece el comportamiento oscilatorio, pues el dominio de parámetros en los que tienen lugar oscilaciones autosostenidas es mucho más grande en el modelo de Leloup y Goldbeter 1998 [20] que en el anterior (modelo de Goldbeter 1995 [29]).

Con este modelo (Leloup y Goldbeter 1998) es posible además demostrar que las oscilaciones autosostenidas ocurrirían aún sin incluir la fosforilación de las proteínas. Si se formara un complejo con  $P_0$  y  $T_0$ , seguirían teniendo lugar las oscilaciones de ciclo límite de igual manera. Sin embargo, el dominio de los parámetros en el que ocurren las oscilaciones aumenta con el grado de fosforilación de las proteínas [20].

El pico de *per* y *tim* ARNm precede al pico de  $C_N$  por unas 5 horas, mientras que el desplazamiento entre el máximo de los ARN mensajeros y el máximo de la cantidad total de PER y TIM ( $P_t$  y  $T_t$ ) es del orden de 3 horas. Observaciones experimentales sin embargo indican que el máximo de PER se encuentra a una distancia de 4 horas del máximo en *per* ARNm [20].

En condiciones de total oscuridad se pueden obtener diagramas de bifurcación en período para los parámetros clave del modelo. Para estos, ocurren oscilaciones autosostenidas en un rango de valores acotado entre dos valores críticos. Estos parámetros son:  $k_{dN}$  (tasa de degradación del complejo en el núcleo),  $k_{sP} = k_{sT}$  (tasa de síntesis de las proteínas),  $k_3, k_4$  (tasa de formación o disociación del complejo PER-TIM) y  $v_{mP}$  (tasa de degradación del *per* ARNm).



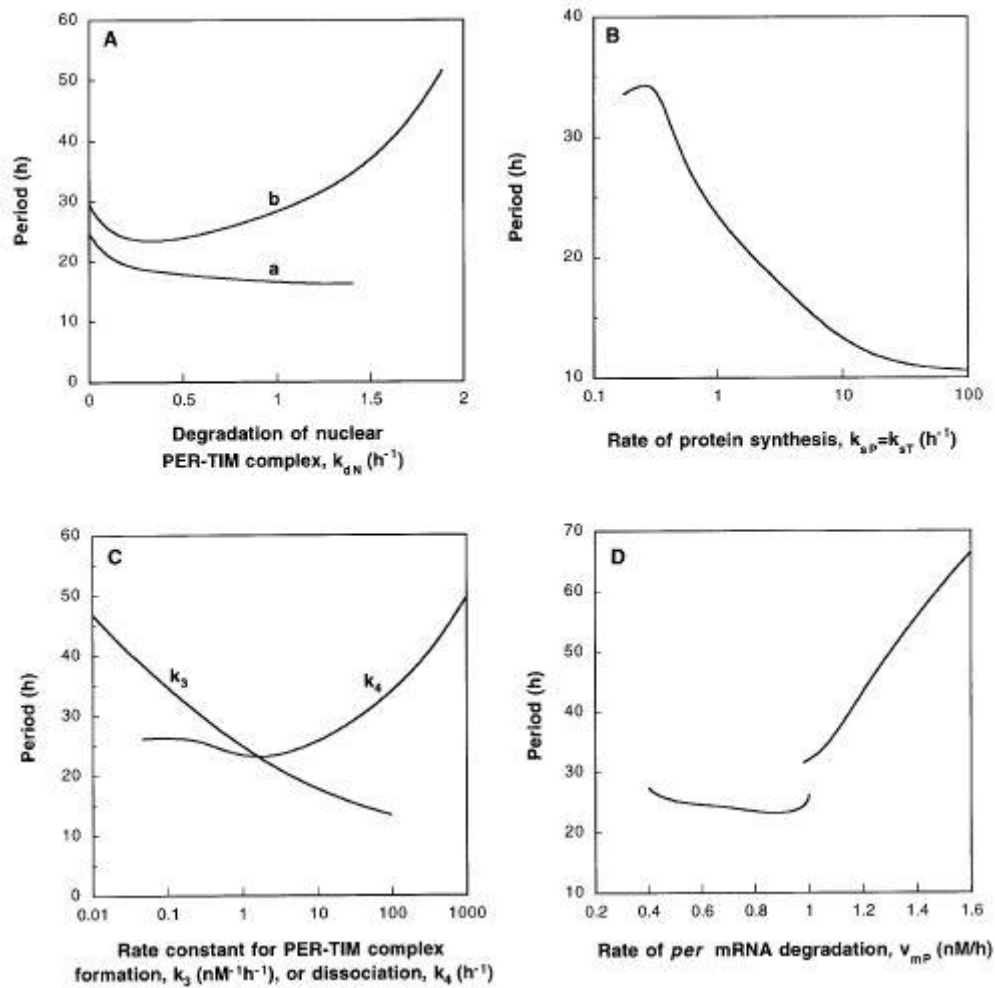


Figura 18: Diagramas de bifurcación que muestran la dependencia del periodo de las oscilaciones frente a diferentes parámetros de control: (A) tasa de degradación del complejo nuclear PER-TIM, (B) tasa de síntesis de las proteínas PER y TIM, (C) constante de formación o disociación del complejo PER-TIM, (D) velocidad de degradación de *per* ARNm. Las curvas se han hecho en condiciones constantes y de oscuridad continua, con el mismo valor de los parámetros que en la figura 16. En la gráfica A, la curva b se ha hecho variando el valor de algunos parámetros:  $V_{2P} = V_{2T} = 5 \text{ nMh}^{-1}$ ,  $V_{4P} = V_{4T} = 5 \text{ nMh}^{-1}$ . En la gráfica D, se observa la existencia de biritmicidad (coexistencia de dos regímenes periódicos) para el rango de valores de  $v_{mP} = 0,989$  a  $0,998 \text{ nMh}^{-1}$ . Imagen tomada de [20].

Como podemos observar en las gráficas, mutaciones que afecten a estos parámetros permitirían conseguir los periodos característicos de las distintas mutaciones ( $per^T$ ,  $per^S$ ,  $per^+$ ,  $per^L$ ).

A continuación introducimos  $v_{dT}$  simulando un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Durante las horas de luz el valor de  $v_{dT}$  es el doble que en oscuridad.

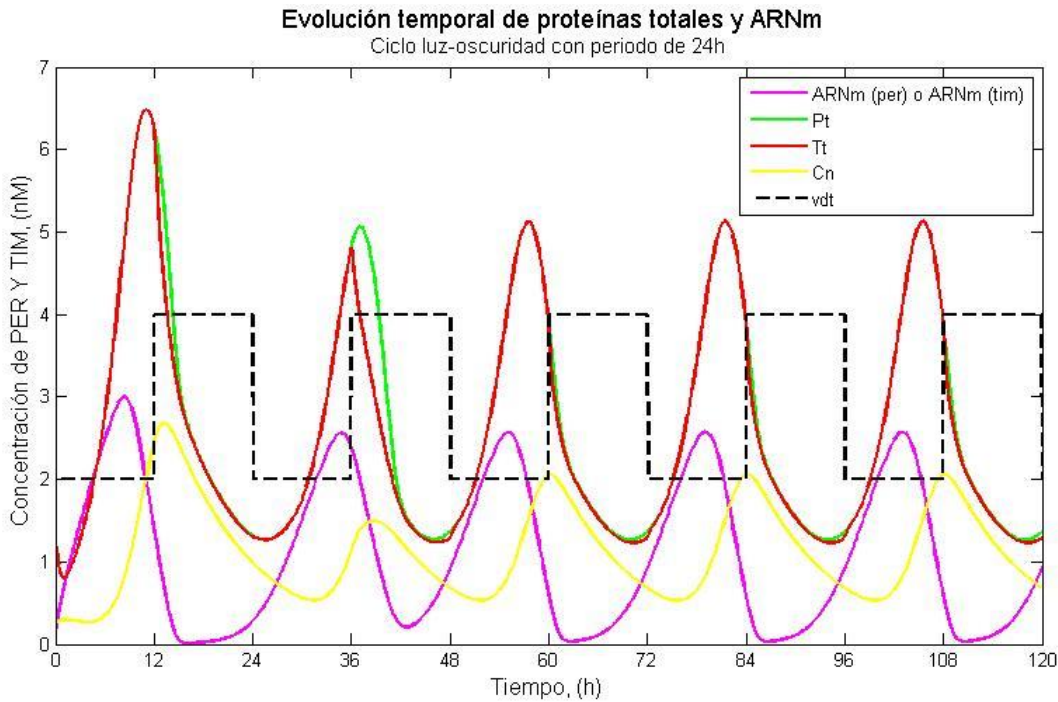


Figura 19: Oscilaciones bajo efecto de un ciclo alternando 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Se muestran oscilaciones con periodos de 24 horas en la concentración de la proteína total PER y TIM ( $P_t$  y  $T_t$ , cuyas curvas coinciden por la simetría de los parámetros del modelo), per ARNm y tim ARNm (que también coinciden), y la cantidad de complejo PER-TIM total existente en el núcleo. La línea discontinua representa el valor de  $v_{dT}$ , que en este caso varía solidariamente con la luz siendo su valor igual a  $4 \text{ nM h}^{-1}$  durante las horas de luz, y  $2 \text{ nM h}^{-1}$  durante las horas de oscuridad. El valor de los parámetros restantes es el utilizado para la integración en la gráfica anterior (Figura 16). Se observa sincronización con la señal luminosa, alcanzándose los máximos de ARNm y de proteína total durante la noche, y coincidiendo el máximo del complejo nuclear con el cambio de luz disminuyendo su concentración durante el día. El resultado concuerda con los datos experimentales [20]. Imagen de elaboración propia.

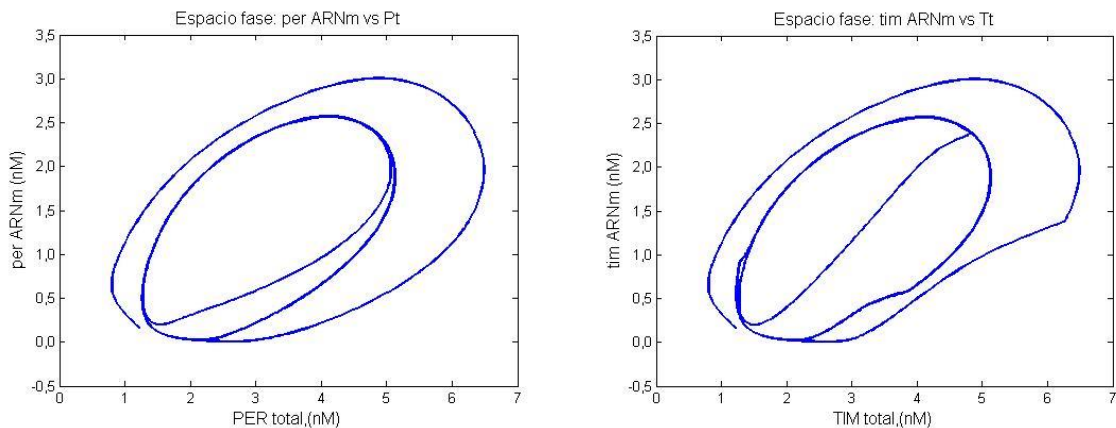


Figura 20: Representación en el espacio de fases. Se observa la evolución hacia un ciclo límite en las dos proteínas. Imagen de elaboración propia.

Al incluir el efecto de la luz del entorno, este modelo permite crear curvas de respuesta de fase teóricas. En la figura 21 es posible comparar la curva de respuesta de fase experimental para *Drosophila* salvaje y la mutación  $per^S$  obtenida por Hall y Rosbash, con la curva obtenida teóricamente a través del modelo matemático.

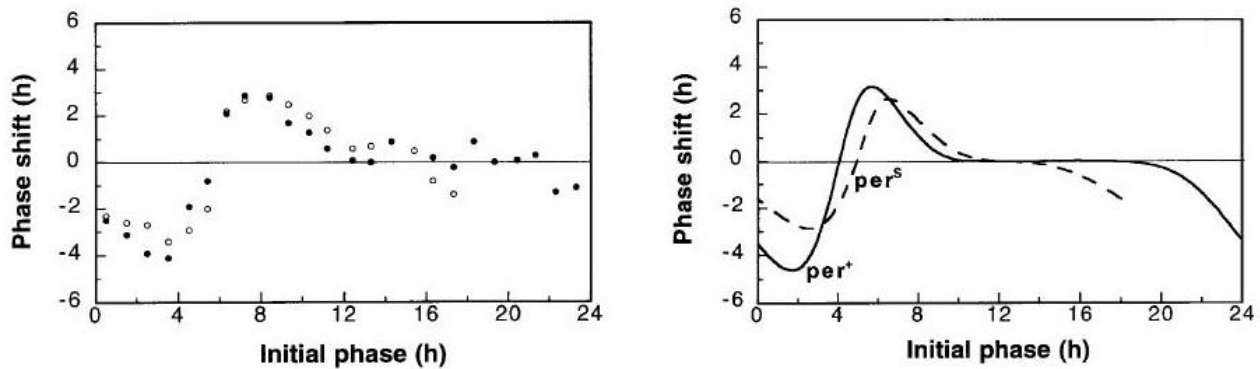


Figura 21: Curvas de respuesta de fase obtenidas experimentalmente (izquierda) y teóricamente por [20] (derecha) para *Drosophila* de tipo salvaje (Wild type,  $per^+$ ) y la mutación  $per^S$ . La curva de la izquierda fue construida por Hall y Rosbash (1987) [30] tomando los datos obtenidos por R.J.Konopka y D.Orr [31] utilizando un pulso de luz de 1 minuto. Los puntos blancos corresponden a la mutación  $per^S$  y los negros a la *Drosophila* de tipo salvaje (Wild type,  $per^+$ ). Imagen obtenida de [20].

#### Experimentación con el modelo

Variando el periodo del ciclo de luz-oscuridad externo (esto es, el periodo de variación de la velocidad de degradación de  $T_2$ ,  $v_{dt}$ ), comprobamos que el acoplamiento de las oscilaciones al ritmo de luz marcado por el parámetro  $v_{dT}$  tiene lugar para periodos del ciclo luminoso con valores entre 20 y 32 horas. Los ciclos luminosos que hemos introducido siempre han contenido el mismo número de horas de luz que de oscuridad (consideramos la mitad del periodo con luz y la otra mitad con oscuridad). Por encima y por debajo de estos valores del periodo se observan oscilaciones complejas.

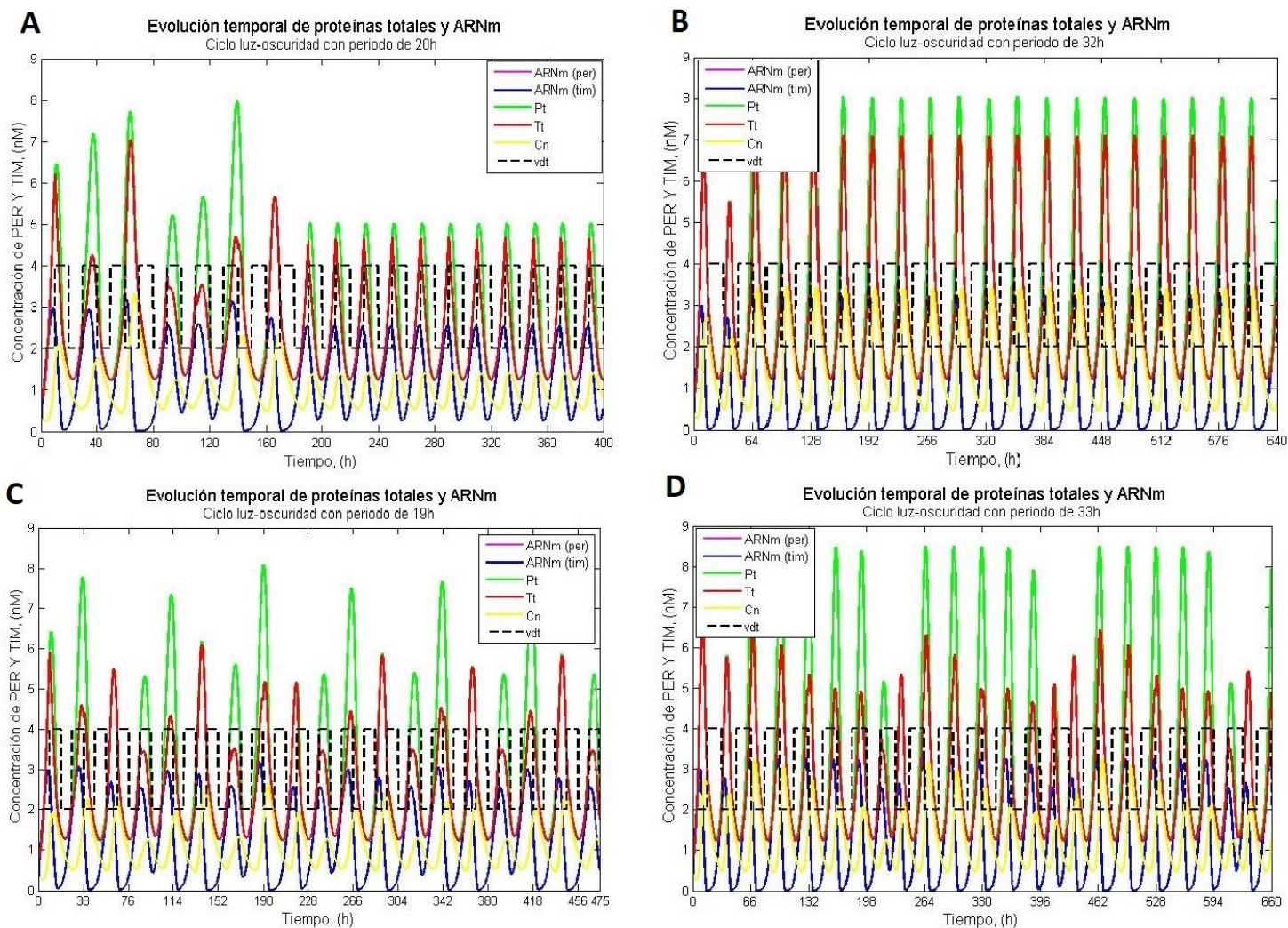


Figura 22: (A) Respuesta del sistema a una señal externa de periodo de 20 horas. (B) Respuesta del sistema a una señal externa de periodo de 32 horas. (C) Respuesta del sistema a una señal externa de periodo de 19 horas. (D) Respuesta del sistema a una señal externa de periodo de 33 horas. Las oscilaciones se sincronizan a la señal externa para periodos entre 20 y 32 horas (Gráficas A y B). Por debajo y por encima de dichos valores del periodo de la señal externa (Gráficas C y D respectivamente) el sistema muestra oscilaciones complejas (de periodo 2 en la Gráfica C y de periodo 6 en la Gráfica D). Imagen de elaboración propia.

Se observa que al aplicar periodos más largos, la amplitud en la concentración que alcanzan las proteínas es mayor que para periodos pequeños.

#### IV. CONCLUSIONES

Los ritmos circadianos tienen la apariencia de oscilaciones en periodos de 24 horas, robustas, autosostenidas y acoplables a un ciclo externo de luz-oscuridad. Los modelos que hemos

visto han tratado de reproducir estas oscilaciones con oscilaciones de tipo ciclo límite utilizando sistemas de ecuaciones diferenciales no lineales.

Los descubrimientos sobre los ritmos circadianos en *Drosophila* de las últimas décadas y los distintos modelos teóricos que se han presentado en este trabajo, muestran cómo la incorporación de nuevos descubrimientos experimentales lleva a un aumento en la complejidad de los modelos teóricos.

El modelo de Van der Pol fue concebido de manera puramente matemática y a pesar de ser el más primitivo de los mostrados en el trabajo sigue vigente por su simplicidad para recrear las oscilaciones y con posibilidad de acoplarse a una señal externa.

El modelo de Goodwin se creó como modelo genérico para oscilaciones biomoleculares y predijo las oscilaciones debidas a la realimentación negativa de la expresión genética.

El modelo de Goldbeter de 1995 simula un modelo molecular mínimo de oscilaciones circadianas donde a la realimentación negativa del ciclo introduce también fosforilaciones múltiples que fortalecen la capacidad de producir oscilaciones autosostenidas.

El modelo de Leloup-Goldbeter de 1998 se basa en un modelo molecular que introduce una segunda red genética la cual permite el acoplamiento a la señal luminosa del entorno y reproduce las curvas de respuesta de fase con bastante similitud a los experimentos. Con este modelo se refuerza el papel de las transformaciones postraduccionales (fosforilación, formación de complejo proteico y transporte al núcleo) en lograr el comportamiento ondulatorio deseado. La experimentación con este modelo nos ha permitido conocer el rango en periodo de la señal forzante al que es capaz de sincronizarse el oscilador.

En definitiva, el ciclo de transcripción-traducción con realimentación negativa de la expresión génica se destaca como componente central de las oscilaciones circadianas.

Nuevos modelos teóricos que introduzcan los descubrimientos más recientes del mecanismo circadiano (como los genes *doubletime* y *cryptochrome*, y las proteínas CLOCK y CYCLE) podrían ofrecer más información sobre las mutaciones existentes y un desplazamiento de fase entre las oscilaciones de PER y *per* ARNm que vaya más acorde a los resultados experimentales. De la misma manera, modelos no deterministas que den cuenta del ruido celular en los parámetros mediante aproximaciones estocásticas serán más fieles a la realidad celular.

Un campo abierto a la investigación en el tema de los ritmos circadianos es cómo se acoplan los relojes circadianos de las distintas células que conforman un tejido para producir oscilaciones coherentes y en fase.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] <http://www.nobelprize.org>
- [2] Hamblen-Coyle, M.J., Wheeler, D.A., Rutila, J.E., Rosbash, M., and Hall, J.C. Behavior of Period-Altered Circadian Rhythm Mutants of *Drosophila* in Light: Dark Cycles (Diptera: Drosophilidae), *Journal of Insect Behavior* **5**, No. 4, pp 417-446 (1992)
- [3] Qiu, J., and Hardin, P.E. Developmental State and the Circadian Clock Interact to influence the Timing of Eclosion in *Drosophila Melanogaster*, *Journal of Biological Rhythms* **11**, No. 1, pp 75-86 (1996)
- [4] Bainbridge, S.P., and Bownes M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology* **66**, pp 57-80 (1981)
- [5] Goldbeter, A. Computational approaches to cellular rhythms. *Nature* **420**, No. 6912, pp 238-245 (2002)
- [6] Tyson, J.J., Hong, C.I., Thron, C.D., and Novak, B. A simple Model of Circadian Rhythms Based on Dimerization and Proteolysis of PER and TIM. *Biophysical Journal* **77**, pp 2411-2417 (1999)
- [7] Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., and Hardin, P.E. Circadian Rhythms from Multiple Oscillators: Lessons from Diverse Organisms. *Nature Reviews Genetics* **6**, No. 7, pp 544-556 (2005)
- [8] Goldbeter, A. Dissipative structures and biological rhythms, *Chaos* **27**, 104612 (2017)
- [9] Ares, S. Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2017. El Ritmo Circadiano. *Revista Española de Física* **31**, No. 4, pp 32-34 (2017)

[10] Ibáñez, C. The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine – Advanced information: Discoveries of Molecular Mechanisms Controlling the Circadian Rhythm, *The Nobel Assembly at Karolinska Institutet*. Artículo disponible en:

<[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2017/advanced-medicineprize2017.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2017/advanced-medicineprize2017.pdf)> (2017)

[11] Gonze, D. Modeling circadian clocks: From equations to oscillations. *Central European Journal of Biology* **6**, No. 5, pp 699-711 (2011)

[12] Phillips, R., Kondev, J., Theriot, J., García, H.G., and Orme, N. *Physical Biology of the Cell*, 2ª edición, Ed. *Garland Science*, New York (2013)

[13] Renn, S.C., Park, J.H., Rosbash, M., Hall, J.C., and Taghert, P.H. A pdf Neuropeptide Gene Mutation and Ablation of PDF Neurons Each Cause Severe Abnormalities of Behavioral Circadian Rhythms in *Drosophila*. *Cell* **99**, No. 7, pp 791-802 (1999)

[14] Freeman, S., Quillin, K., and Allison, L. *Fundamentos de Biología*, 5ª edición, Ed. *Pearson Education*, Madrid (2013)

[15] Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology, *Nature* **227**, pp 561-563 (1970)

[16] Buldú, J.M., Wagemakers, A., Sanjuán, M.A.F., Coloma, A., y De Luis, O. Redes genéticas sintéticas: de lo simple a lo complejo. *La Física en las Ciencias de la Vida, Revista Española de Física* **21**, No. 3, pp 27-33 (2007)

[17] Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Introducción a la Biología Celular*, 6ª edición, *Editorial médica panamericana*, New York (2011)

[18] Konopka R.J. and Benzer, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**, pp 2112-2116 (1971)

[19] Takahashi J.S. Finding new clock components: past and future. *Journal of Biological Rhythms* **19**, No. 5, pp 339-347 (2004)

- [20] Leloup, J.C. and Goldbeter, A. A model for circadian rhythms in *Drosophila* incorporating the formation of a complex between the PER and TIM proteins. *Journal of biological rhythms* **13**, No. 1, pp 70-87 (1998)
- [21] Montero, F., y Morán, F. Procesos de autoorganización en Biología, Ed. *Eudema*, Madrid (1992)
- [22] Larraza Hernández, S., y Palencia Gómez, V.J. El oscilador de Van der Pol. *Multidisciplina* **5**, pp 93-102 (2010)
- [23] Kronauer R.E., Czeisler C.A., Pilato S.F., MooreEde M.C., and Weitzman E.D. Mathematical model of the human circadian system with two interacting oscillators. *Am J Physiol* **242**, pp R3-R17 (1982)
- [24] Kunz, H., and Achermann, P. Simulation of circadian rhythm generation in the suprachiasmatic nucleus with locally coupled self-sustained oscillators. *Journal of Theoretical Biology* **224**, pp 63–78 (2003)
- [25] Goodwin B.C. Oscillatory behavior in enzymatic control processes, *Adv Enzyme Regul* **3**, pp 425-438 (1965)
- [26] Griffith J.S. Mathematical of celular control processes. I. Negative feedback to one gene. *J Theor Biol* **20**, pp 202-208 (1968)
- [27] Nicolis, G. and Prigogine, I. Self-Organisation in Nonequilibrium Systems. From Dissipative Structures to Order through Fluctuations. *Wiley*, New York (1977)
- [28] Ruoff P., Vinsjevnik M., Monnerjahn C., and Rensing L. The Goodwin oscillator: on the importance of degradation in the circadian clock. *J Biol Rhythms* **14**, pp 469-479 (1999)
- [29] Goldbeter, A. A model for circadian oscillations in the *Drosophila* period protein (PER). *Proceedings: Biological Sciences/ The Royal Society*, **261**, No. 1362, pp 319-324 (1995)
- [30] Hall J.C. and Rosbash, M. Genetic and Molecular Analysis of Biological Rhythms. *J Biol Rhythms* **2**, No. 3, pp 153-178 (1987)



[31] Konopka R. and Orr, D. Effects of a clock mutation on the subjective day—implications for a membrane model of the *Drosophila* circadian clock. In: Siddiqi O., Babu P., Hall L.M., and Hall, J.C. (eds). *Development and Neurobiology of Drosophila. Basic Life Sciences* **16**, pp 409-416, Springer, Boston, MA (1980)

## Anexo I

### Código Matlab para la resolución del modelo de Goldbeter 1995

```
%%% Drosophila PER
clear; clc

%% Condiciones iniciales y límites de integración

x0=[0.1, 0.25, 0.25, 0.25, 0.25]; % M_0, P0_0, P1_0, P2_0, Pn_0 (uM)
sspan=[0, 4*24]; % Tiempo en horas

%% Integración

options=odeset('InitialStep',0.01,'MaxStep',1,'RelTol',1e-1,'AbsTol',1e-6,'Refine',5);
[s,x]=ode45 (@GoldbeterPER,sspan,x0);

%% Soluciones
Mp= x(:,1); % per mRNA concentration
P0=x(:,2); % PER unphosphorilated
P1=x(:,3); % PER first phosphorilation
P2=x(:,4); % PER second phosphorilation
Pn=x(:,5); % PER nuclear

Pt=P0+P1+P2+Pn; %Proteína total

%% Representación frente al tiempo
clf;
figure(1)
plot(s,x,'LineWidth',1.5)
hold on
plot(s,Pt,'k--','LineWidth',1.5)
title({'\fontsize{13} Evolución temporal de las concentraciones';'\fontsize{11}Modelo de Goldbeter 1995'})
legend('ARNm','P_0','P_1','P_2','P_N','P_t');
xlabel('\fontsize{12}Tiempo, (h)');
ylabel('\fontsize{12}Concentración de PER Y ARNm, ( \muM)');
axis([0,max(s),0,6])

hold off

%% Representación M vs Pt

figure(2)
plot(Pt,x(:,1),'LineWidth',1.5)
title({'\fontsize{13}Plano de fases ARNm vs Pt';'\fontsize{11}Modelo de Goldbeter 1995'})
xlabel('\fontsize{12}Pt ( \muM)');
ylabel('\fontsize{12} ARNm ( \muM)');
axis equal
axis([0.5,5.5,0,3.5])
```

## Anexo II

### Función GoldbeterPER

```
function dxds=GoldbeterPER(s,x)

%% Parámetros

vs=0.76; % synthesis rate (uM/h^-1)
KI=1; % Hill's repression constant (uM)
n=4; % degree of Hill's equation
vm=0.65; % mRNA degradation rate (uM/h^-1)
Km=0.5; % Michaelis constant of mRNA degradation by an enzyme (uM)
ks=0.38; % PER synthesis rate constant (h^-1)

V1=3.2; % P0 phosphorylation: maximum rate (uM/h^-1)
K1=2; % P0 phosphorylation: Michaelis constant (uM)
V2=1.58; % P1 dephosphorylation: maximum rate (uM/h^-1)
K2=2; % P1 dephosphorylation: Michaelis constant (uM)
V3=5 ;% P1 phosphorylation: maximum rate (uM/h^-1)
K3=2; % P1 phosphorylation: Michaelis constant (uM)
V4=2.5; % P2 dephosphorylation: maximum rate (uM/h^-1)
K4=2; % P2 dephosphorylation: Michaelis constant (uM)

vd=0.95; % P2 degradation rate (uM/h^-1)
Kd=0.2; % Michaelis constant of P2 degradation (uM)
k1=1.9; % P2 transport into the nucleus rate constant (h^-1)
k2=1.3; % Pn transport into the cytosol rate constant (h^-1)

%% Variables
M= x(1); % mRNA concentration
P0=x(2); % PER unphosphorylated
P1=x(3); % PER first phosphorylation
P2=x(4); % PER second phosphorylation
Pn=x(5); % nuclear PER

%% Ecuaciones
dMds= vs*KI^n/(KI^n+Pn^n) -vm*M/(Km+M);
dP0ds= ks*M -V1*P0/(K1+P0) +V2*P1/(K2+P1);
dP1ds= V1*P0/(K1+P0) -V2*P1/(K2+P1) -V3*P1/(K3+P1) +V4*P2/(K4+P2);
dP2ds= V3*P1/(K3+P1) -V4*P2/(K4+P2) -k1*P2+k2*Pn -vd*P2/(Kd+P2);
dPnds= k1*P2-k2*Pn;

dxds=[dMds; dP0ds; dP1ds; dP2ds; dPnds];
end
```

## Anexo III

### Código Matlab para la resolución del modelo de Leloup y Goldbeter 1998

```
%%% Drosophila PER-TIM
clear;clc

%% Condiciones iniciales y límites de integración
T=24; % Periodo perturbación (h)
N=5; % Ciclos a representar
x0=[0.15, 0.25, 0.25, 0.25, 0.15, 0.25, 0.25, 0.25, 0.25, 0.25]; % Mp_0, P0_0, P1_0, P2_0, Mt_0, T0_0, T1_0, T2_0, C_0, Cn_0 (nM)
sspan=[0, N*T]; % Tiempo en horas

%% Integración
options=odeset('InitialStep',0.01,'MaxStep',1,'RelTol',1e-1,'AbsTol',1e-6,'Refine',5);
[s,x]=ode45 (@GoldbeterPERTIM,sspan,x0);

%% Resultados
Mp= x(:,1); % per mRNA concentration
P0=x(:,2); % PER unphosphorilated
P1=x(:,3); % PER first phosphorilation
P2=x(:,4); % PER second phosphorilation
Mt=x(:,5); % tim mRNA concentration
T0=x(:,6); % TIM unphosphorilated
T1=x(:,7); % TIM first phosphorilation
T2=x(:,8); % TIM second phosphorilation
C=x(:,9); % cytosol complex
Cn=x(:,10); % nuclear complex

Pt=P0+P1+P2+C+Cn; %PER total
Tt=T0+T1+T2+C+Cn; %TIM total

%% Representación frente al tiempo
figure (1)
plot(s,x,'LineWidth',1.5)
title({'\fontsize{13} Oscilaciones circadianas';'\fontsize{11}Modelo de Goldbeter 1998'})
legend('ARNm (per)', 'P0', 'P1', 'P2', 'ARNm (tim)', 'T0', 'T1', 'T2', 'C', 'Cn');
xlabel('\fontsize{12}Tiempo, (h)');
ylabel('\fontsize{12}Concentración de PER Y TIM, (nM)');

% Parámetro vdt
vdt_0=2; % T2 darkness degradation rate (nM/h)
h=s/(T/2);
f=floor(h);
b=rem(f,2);
vdt=vdt_0+2*b; % T2 dark-light degradation rate (nM/h)

figure (2)
plot(s,Mp,'m',s,Pt,'g',s,Tt,'r',s,Cn,'y',s,vdt,'k--','LineWidth',1.5)
title({'\fontsize{13} Evolución temporal de proteínas totales y ARNm';'\fontsize{11}Ciclo luz-oscuridad de 12h'})
legend('ARNm (per) o ARNm (tim)', 'Pt', 'Tt', 'Cn', 'vdt');
xlabel('\fontsize{12}Tiempo, (h)');
ylabel('\fontsize{12}Concentración de PER Y TIM, (nM)');
```

```

%% Representación en el espacio de fase
figure (3)
plot(Pt,Mp, 'LineWidth',1.5)
xlabel('\fontsize{12}PER total, (nM)');
ylabel('\fontsize{12}per ARNm (nM)');
title('\fontsize{12}Espacio fase: per ARNm vs Pt');
axis([0,7,-0.5,3.5])

figure (4)
plot(Tt,Mt, 'LineWidth',1.5)
xlabel('\fontsize{12}TIM total, (nM)');
ylabel('\fontsize{12}tim ARNm (nM)');
title('\fontsize{12}Espacio fase: tim ARNm vs Tt');
axis([0,7,-0.5,3.5])

```

## Anexo IV

### **Función GoldbeterPERTIM**

```
function dxds=GoldbeterPERTIM(s,x)

T=24; % Periodo perturbación (h)

%% Parámetros
vsp=1; % synthesis rate (nM/h^-1)
KIp=1; % Hill's repression constant (nM)
n=4; % degree of Hill's equation
vmp=0.7; % mRNA degradation rate (nM/h)
Kmp=0.2; % Michaelis constant of mRNA degradation by an enzyme (nM)
kd=0.01; % linear degradation constant (h^-1)
ksp=0.9; % PER synthesis rate constant (h^-1)

V1p=8; % P0 phosphorylation: maximum rate (nM/h^-1)
K1p=2; % P0 phosphorylation: Michaelis constant (nM)
V2p=1; % P1 dephosphorylation: maximum rate (nM/h^-1)
K2p=2; % P1 dephosphorylation: Michaelis constant (nM)
V3p=8; % P1 phosphorylation: maximum rate (nM/h^-1)
K3p=2; % P1 phosphorylation: Michaelis constant (nM)
V4p=1; % P2 dephosphorylation: maximum rate (nM/h^-1)
K4p=2; % P2 dephosphorylation: Michaelis constant (nM)

vdp=2; % P2 degradation rate (nM/h)
Kdp=0.2; % Michaelis constant of P2 degradation (nM)
k3=1.2; % complex formation rate constant
k4=0.6; % Complex dissociation rate constant (h^-1)

vst=1; % synthesis rate (nM/h)
KI_t=1; % Hill's repression constant (nM)
vmt=0.7; % tim mRNA degradation rate (nM/h)
Kmt=0.2; % Michaelis constant of tim mRNA degradation by an enzyme (nM)
kst=0.9; % PER synthesis rate constant (h^-1)
V1t=8; % P0 phosphorylation: maximum rate (nM/h^-1)
K1t=2; % P0 phosphorylation: Michaelis constant (nM)
V2t=1; % P1 dephosphorylation: maximum rate (nM/h^-1)
K2t=2; % P1 dephosphorylation: Michaelis constant (nM)
V3t=8; % P1 phosphorylation: maximum rate (nM/h^-1)
K3t=2; % P1 phosphorylation: Michaelis constant (nM)
V4t=1; % P2 dephosphorylation: maximum rate (nM/h^-1)
K4t=2; % P2 dephosphorylation: Michaelis constant (nM)

Kdt=0.2; % Michaelis constant of P2 degradation (nM)
k1=0.6; % complex transport into the nucleus rate constant (h^-1)
k2=0.2; % Complex transport into the cytosol rate constant (h^-1)
kdc=0.01; % complex degradation (h^-1)
kdn=0.01; % nuclear complex degradation (h^-1)

% Parámetro vdt
vdt_0=2; % T2 darkness degradation rate (nM/h)
h=s/(T/2);
f=floor(h);
b=rem(f,2);
vdt=vdt_0+2*b; % T2 dark-light degradation rate (nM/h)
```

```

%% Variables
Mp= x(1); % per mRNA concentration
P0=x(2); % PER unphosphorilated
P1=x(3); % PER first phosphorilation
P2=x(4); % PER second phosphorilation
Mt=x(5); % tim mRNA concentration
T0=x(6); % TIM unphosphorilated
T1=x(7); % TIM first phosphorilation
T2=x(8); % TIM second phosphorilation
C=x(9); % cytosol complex
Cn=x(10); % nuclear complex

%% Ecuaciones
dMpdS= vsp*KIp^n/(KIp^n+Cn^n) -vmp*Mp/(Kmp+Mp)-kd*Mp;
dP0ds= ksp*Mp -V1p*P0/(K1p+P0) +V2p*P1/(K2p+P1)-kd*P0;
dP1ds= V1p*P0/(K1p+P0) -V2p*P1/(K2p+P1) -V3p*P1/(K3p+P1) +V4p*P2/(K4p+P2) -kd*P1;
dP2ds= V3p*P1/(K3p+P1) -V4p*P2/(K4p+P2) -k3*P2*T2+k4*C -vdp*P2/(Kdp+P2) -kd*P2;

dMtds= vst*KIt^n/(KIt^n+Cn^n) -vmt*Mt/(Kmt+Mt)-kd*Mt;
dT0ds= kst*Mt -V1t*T0/(K1t+T0) +V2t*T1/(K2t+T1)-kd*T0;
dT1ds= V1t*T0/(K1t+T0) -V2t*T1/(K2t+T1) -V3t*T1/(K3t+T1) +V4t*T2/(K4t+T2) -kd*T1;
dT2ds= V3t*T1/(K3t+T1) -V4t*T2/(K4t+T2) -k3*P2*T2+k4*C -vdt*T2/(Kdt+T2) -kd*T2;

dCds=k3*P2*T2 -k4*C -k1*C +k2*Cn -kdc*C;
dCnds=k1*C -k2*Cn -kdn*Cn;

dxds=[dMpdS; dP0ds; dP1ds; dP2ds; dMtds; dT0ds; dT1ds; dT2ds; dCds; dCnds];

```